

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Des frères Mentouri–Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre : 228/Ds/2017

N° de série :05/Bioch/2017

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en sciences**

Option : Biochimie microbienne

Présentée et soutenue par : M^{me} **MOSBAH CAMELIA**

Thème

**Etude de l'effet antimycotoxinogène et antihépatotoxique
des extraits d'une plante utilisée dans la thérapie
traditionnelle**

Soutenu le :09/01/2017

Président de jury : Mr. HAMIDECHI M. A.
Directeur de thèse : Mr. KACEM CHAOUCHE N.
Examineurs : Mr. RIBA A
Mr. DEHIMAT L.
Mr. BOULAKHSAIM M.
Mr. KHANNOUF. S

Prof Univ. Constantine.
Prof. Univ. Constantine.
Prof Univ. Boumerdes.
Prof Univ. Constantine.
Prof Univ. Oum El Bouaghi.
Prof Univ. Sétif.

ANNEE UNIVERSITAIRE:2017-2018

Remerciements

*Mes remerciements, avant tout, à **DIEU** tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant toutes ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.*

*Mes remerciements à mon promoteur, le Professeur **N.Kacem Chaouche**. Merci pour votre confiance, pour l'autonomie qu'il m'a laissé, m'ont permis de réaliser cette Thèse.*

*Et sans oublier mon co-encadreur le professeur **Benboubetra M**, je profite l'occasion et je m'incline devant son âme et que dieu l'accepte dans son paradis Inchaa Allah.*

*Je n'arrive pas à trouver de mots pour exprimer la reconnaissance que j'ai à l'égard du Docteur **I. Dahmane** et professeur **M. Terrak** qui m'ont donné la chance de travailler dans le centre de recherche (CIP).*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur, **Hamidechi. A.** Professeur au département De Microbiologie de l'université Constantine1 pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de présider le jury de cette thèse.*

*Messieurs les professeur **Dehimat L.** et **Boulakhssaim M** et **Khanouf S, RibaA**, trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de participer au jury de soutenance et pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.*

*Plein d'amour et beaucoup de reconnaissance à mes adorables amies, soeurs **Nadera, Amel, Asma** et auxquelles j'adresse mes sincères sentiments de gratitude et pour tous ce qu'elles m'ont apporté que ce soit sur le plan personnel ou professionnels*

Merci mes chères adorables amies

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité microbienne (**LaMyBAM**) : **Radia, Imen, Asma, Mounira, Hamida, Hajer, Sara, Mounia**, Pour leur collaboration et serviabilité qu'elles m'ont témoignées durant ces dernières années.*

*Un remerciement particulier au Dr **Nassim Moula**, pour son soutien permanent, ses aides précieuses et sa disponibilité permanente à chaque fois j'avais besoin de lui lors de mon séjour en Belgique. Grand merci Nassim*

DEDICACES

A mes très chers parents

MAMAN

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'affection que j'ai toujours eus pour toi. Ce travail est le fruit des efforts et sacrifices que tu as consenti pour mon éducation et ma formation. Que Dieu te prête longue vie et bonne santé. Avec beaucoup de patience et de volonté, tu t'es sacrifiée pour nous, tu as tout fait pour que j'arrive à mon but. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Tu es une mère formidable, je t'aime...

PAPA

Je n'ai été guidé que par le désir de t'honorer. J'espère qu'aujourd'hui tu es fier de moi. Tes conseils, ta bienveillance et tes encouragements m'ont permis de dépasser toutes les difficultés. Que ce travail soit le témoignage de ma gratitude et de toute mon affection. Tu mérites sans conteste qu'on te décerne le prix 'père exemplaire', je t'aime... Que Dieu vous garde et vous procure, maman et toi, longue vie, santé et bonheur, afin que vous demeuriez le soleil qui illumine notre vie. A vous, je dois ce que je suis.

Et à mes adorables enfants Wail Abed Al-Moiz, Hanane –Maria, et

Ahmed yacine

La joie de ma vie, je vous aime très très très fort ...

A Mes chers frères Lamine, Djalil et Youcef

En témoignage de toute l'affection et des profonds sentiments fraternels que je vous porte et de l'attachement qui nous unit. Je vous souhaite du bonheur et du succès dans toute votre vie.

Avant propos

Notre étude a été menée grâce à la contribution de cinq laboratoires. Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne « **LaMyBAM** », faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université de Constantine 1, sous la direction de Monsieur le professeur Kacem chaouche N. Laboratoire des Microorganismes et des Biomolécules Actives « **LMBA** », Tunisie., sous la direction du professeur Boudabous Abdelatif. Centre d'Ingénierie des Protéines « **CIP** » à Université de Liège, Belgique, sous la direction de Monsieur le professeur Mohamed terrak. Laboratoire d'anapathologie et d'hématologie du Centre Hôpitalo-Universitaire « **CHU** » de Constantine.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux responsables de ces laboratoires pour m'avoir apporté les moyens humains et matériels qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.



LaMyBAM

L'activité antimycotoxinogène a été réalisée au Laboratoire LaMYBAM, Université de Constantine 1.



L'identification moléculaire de l'isolat fongique a été réalisée au niveau de laboratoire LMBA



L'analyse par HPLC –PDA est réalisée au Centre d'Ingénierie des Protéines « CIP » Université de Liège.



Le dosage des composés phénoliques et l'activité antioxydante a été réalisé au niveau de laboratoire de Biochimie de Oum Bouaghi.



L'activité antihépatotoxique a été réalisée au niveau de Laboratoire d'anapathologie et d'hématologie du Centre Hôpitalo-Universitaire « **CHU** » de Constantine.

Les acronymes

ADN : Acide désoxyribonucléique

ACT : Fraction d'acétate déthyle

AF : Aflatoxine

ALAT: Alanine Amino Transférase

APG : Angiosperms Phylogeny Group.

ARN: Acide ribonucléique

ASAT: AspartateAmino Transférase

AVN : Averantine

a_w : Activité de l'eau

BUT : Fraction butanolique

CAT : Catalase

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE₅₀ : Concentration effectrice

CFS : Concentrations fongistatiques

CLHP-DAD-ESI-SM : High-Performance Liquid Chromatography coupled to photodiode

CMF : Concentrations minimales fongicides

CMI :Concentrations minimales inhibitrices

CoA : Coenzyme-A

CYP : cytochrome P450

DHOMST: dihydro-O-methylsterigmatocystine

DL50 : dose létale

DPPH :diphénylpicrylhydrazyl

ELL: Extraction liquide-liquide

EOR : Espèces oxygénées réactives

ESL: Extraction solide-liquide

FAO : Food and Agricultural Organization

FAS : Fatty Acid Synthase

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GSH :glutathionréduit

HCC : Hépatocarcinome

HPLC-PDA: High-Performance Liquid Chromatography coupled to photodiode array detector

IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer.

IC₅₀ : Concentration d'inhibition

ITS: Internal Transcribed Spacer

LBP: Polysaccharides

MDA : Malondialdéhy

MH : Mueller-Hinton

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydride

NOR : Norsolorinique

OMS : Organisation mondiale de la Santé

OMST: O-methyl-sterigmatocystine

PAL : Phosphatases alcalines

PCR : Polymerase chain reaction

PDA : Potato dextrose agar

PDB : potato dextrose broth

PKS : polycétone synthase

R_f : Rapport frontale

SOD : Superoxyde dismutase

TBHQ: Hydroquinone butylique tertiaire

TGO : Glutamate Oxaloacétique Transaminase

TGP : Glutamate Pyruvate Transaminase

t_R : Temps de rétention

VERB : Versicolorine B

VHB : Virus de l'hépatite B

VIS-UV: visible et ultraviolet

YES : Yeast Extract Sucrose

Listes des figures

Figure 1. Caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	7
Figure 2. Structure des aflatoxines.....	9
Figure 3. Structure chimique de l'aflatoxine B1.....	9
Figure 4. Voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 de l' <i>A. flavus</i>	11
Figure 5. Voie métabolique d'AFB1.....	13
Figure 6. Photos de l'isolement des moisissures.....	19
Figure 7. Photos représentant la purification des isolats I₁ (à gauche) et I₂ (à droite).....	20
Figure 8. Aspect des colonies de l'isolat sélectionné sur milieu PDA	21
Figure 9. Aspect microscopique de l'isolat sélectionné sous microscope optique.....	22
Figure 10. Migration des bandes d'ADN d' <i>ITS</i> de l'isolat I₁ sur gel d'agarose.....	23
Figure 11. Séquences finales du gène <i>ITS</i> après avoir été corrigé à l'aide du programme «Bioedit».....	24
Figure 12. Distribution du genre <i>Lycium</i> dans le monde.....	27
Figure 13. Planche botanique de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	29
Figure 14. Localisation géographique de djebel Chettaba.....	34
Figure 15. Schéma résumant les étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>Lycium halimifolium</i> Mill par les solvants organique.....	41
Figure 16. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) équipé d'un détecteur photodiodes (PDA) couplé à un collecteur (Fraction Collector III).....	45
Figure 17. Photos de <i>Lycium halimifolium</i> Mill dans leur habitat naturel.....	49
Figure 18. Rendements des extraits des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill	51
Figure 19. Profil du chromatogramme du mélange des étalons entre 280-325 nm.....	55
Figure 20. Chromatogramme obtenu entre 280-325 nm de la fraction ACT des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	56
Figure 21. Chromatogramme obtenu entre 280-325 nm de la fraction BUT des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	58
Figure 22. La contamination des arachides par l' <i>Aspergillus flavus</i>	62
Figure 23. Méthode d'extraction des aflatoxine.....	71
Figure 24. Chromatographie sur couche mince.....	72
Figure 25. Mécanisme d'action de DPPH.....	76
Figure 26. Test de mycotoxinogénèse.....	81
Figure 27. la biomasse produite de la fermentation.....	82
Figure 28. Chromatographie sur couche mince présentant les spots d'AFTB1 produite par <i>A. flavus</i> révélée sous lumière UV 36.....	83
Figure 29. Profil HPLC de la production d'Aflatoxine B1 par <i>Aspergillus flavus</i>	85
Figure 30. Profil de détection de l'aflatoxine B1 par chromatographie sur couche mince (CCM) de gauche à droite.....	87
Figure 31. Profil HPLC de la production d'Aflatoxine B1 par <i>Aspergillus flavus</i> traité avec la fraction ACT, et la fraction BUT des feuilles de <i>L. halimifolium</i> Mill.....	88

Figure 32. Zone d'inhibition de la fraction active relative aux souches sensibles.....	92
Figure 33. Profils d'activité antiradicalaire des fractions (BUT et ACT) des feuilles de <i>Lycium .halimifolium</i> M.....	94
Figure 34. Anatomie segmentaire du foie.....	98
Figure 35. L'organisation du foie	99
Figure 36. Le cycle d'oxydoréduction du glutathion.....	103
Figure 37. Principe du dosage du malondialdéhyde.....	107
Figure 38. Principe de dosage du glutathion.....	108
Figure 39. Evolution du poids des souris témoins et traités durant le traitement.....	111
Figure 40. Effet de l'AFB1 sur le poids des foies des souris.....	112
Figure 41. Paramètres sériques de l'évaluation de la fonction hépatique (TGP, TGO et PAL) des souris témoins, souris traités par la dose de 500mg/kg de l'ACT et BUT et souris intoxiqués par la dose de 0,7mg/kg de l'AFB.....	113
Figure 42. Effet de AFB1, de la fraction ACT et BUT de <i>Lycium hlimifolium</i> M sur les paramètres de stress oxydative.....	116
Figure 43. Aspect microscopique du foie de lot témoin (G×40).....	120
Figure 44. Aspect microscopiques du foie des animaux traités par l'AFB1	120
Figure 45. Aspect microscopique du foie des animaux traités par l'ACT (a) et But (b) puis intoxiqués par le B1 (G×40).....	121

Liste des tableaux

Tableau 1. Programme utilisé en HPLC analytique (temps, le gradient de solvant, débit).....	46
Tableau 2. Screening chimique des extraits de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	50
Tableau 3. Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill en pourcentage par rapport au poids total.....	51
Tableau 4. Dosage des composés phénoliques des fractions des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	52
Tableau 5. Analyse quantitative et qualitative de la fraction ACT des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	57
Tableau 6. Analyse quantitative et qualitative de la fraction ACT des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	56
Tableau 7. Programme utilisé en HPLC analytique (temps, gradient de solvant, débit).	74
Tableau 8. Taux d'inhibition de l' <i>Aspergillus flavus</i>	78
Tableau 9. Concentration minimal inhibitrice (CMI), activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en µg/ml.....	78
Tableau 10. La biomasse et le % d'inhibition de la croissance <i>Aspergillus flavus</i> traité par ACT et BUT.....	86
Tableau 11. Diamètres d'inhibition des différents fractions vis-à-vis les germes testés	91
Tableau 12. Les IC ₅₀ des fractions ACT et BUT des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> M et de la quercitine.....	94
Tableau 13. Bilan hépatique des groupes de souris traités avec les fractions des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> M (500mg/kg) par rapport au groupe de souris normaux.....	113
Tableau 14. Effet des fractions ACT et BUT des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill sur certains marqueurs du stress oxydatif tissulaire chez les souris atteints de l'hépatotoxicité.	116

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....1

CHAPITRE I : MYCETES MYCOTOXINOGENES.

1. Introduction	4
2. Revue bibliographique	5
2.1.Moisissures mycotoxinogènes.....	5
2.2.Facteurs influençant la toxinogénèse.....	5
2.2.1. Facteurs extrinsèques.....	5
2.2.2. Facteurs intrinsèques	6
2.3.Genre <i>Aspergillus</i>	6
2.4. <i>Aspergillus flavus</i>	7
2.5. Mycotoxines	7
2.6.Les aflatoxines (AFs).....	8
2.6.1. Généralités.....	8
2.7. Aflatoxine B1.....	9
2.7.1.Biosynthèse de l'aflatoxine B1.....	10
2.7.2. Métabolisme de l'aflatoxine B1.....	12
3. Matériel et méthodes	14
3.1. Echantillonnage.....	14
3.2. Isolement des moisissures.....	14
3.3. Purification.....	14
3.4. Conservation des moisissures.....	15
3.5. Identification de l'isolat fongique.....	15
3.5.1. Observation macroscopique	15
3.5.2. Observation microscopique.....	15
3.5.2.1.Observation à l'état frais.....	15
3.5.2.2.Observation par coloration au bleu de méthylène.....	16
3.5.3. Etude moléculaire.....	16
3.5.3.1.Extraction de l'ADN fongique.....	16
3.5.3.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	16
3.5.3.3.Electrophorèse des acides nucléiques.....	18
3.5.3.4. Analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques.....	18
4. Résultats et discussion	19
4.1. Isolement et purification.....	19
4.2. Identification de l'isolat sélectionné.....	21
4.2.1. Critères d'identification macroscopique.....	21
4.2.2. Critères d'identification microscopique.....	22
4.2.3. Caractérisation moléculaire de l'isolat.....	23
4.2.3.1.Extraction d'ADN.....	23
4.2.3.2.Amplification de séquence d'ADN- ITS.....	23
4.2.3.3.Séquençage.....	24

CHAPITRE II : MATERIEL VEGETAL

1. Introduction.....	26
2. Synthèse Bibliographique.....	27
2.1. Le <i>Lycium</i>	27
2.1.1. Habitat naturel.....	27
2.1.2. Caractéristique de la famille de solanacées.....	27
2.1.3. Caractéristiques du genre <i>Lycium</i>	28
2.1.4. Description botanique de <i>Lycium</i>	28
2.1.5. Nomenclature et systématique de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	29
2.1.5.1. Nomenclature.....	29
2.1.5.2. Systématique.....	30
2.2. Composition chimique de la plante	30
2.2.1. Principaux constituants de la baie de goji.....	30
2.2.1.1. Composés phénoliques.....	30
2.2.1.2. Caroténoïdes	31
2.2.1.3. Autres constituants	31
2.2.2. La composition des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	32
2.2.3. Principaux constituants des écorces	32
2.2.4. Principaux constituants des fleurs	32
2.3. Propriétés pharmacologiques de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	32
2.3.1. Renforcement du système immunitaire.....	32
2.3.2. Effet régulateur du diabète de type 2, hypolipémiant et antihypertenseur	33
2.3.3. Effet neuroprotecteur dans les maladies neurodégénératives.....	33
2.3.4. Effet protecteur de la vision, contre le glaucome, la dégénérescence maculaire et la cataracte.....	34
3. Matériels et Méthodes	
3.1. Enquête ethnobotanique	35
3.2. Lieu et période de cueillette de la plante.....	35
3.3. Préparation de l'échantillon.....	36
3.4. Le criblage phytochimique.....	36
3.4.1. Tests des métabolites secondaires.....	36
3.4.1.1. Test des alcaloïdes	36
3.4.1.2. Test des saponosides.....	36
3.4.1.3. Test des stérols et triterpènes.....	37
3.4.1.4. Test des dérivés anthracéniques.....	37
3.4.1.5. Test des tanins.....	38
3.4.1.6. Test des coumarines.....	38
3.4.1.7. Test de phlobatannins.....	38
3.4.1.8. Test des résines.....	39
3.4.1.9. Test de flavonoïdes.....	39
3.4.1.10. Composés volatils.....	39
3.4.1.11. Les composés réducteurs.....	39
3.4.2. Tests des métabolites primaires.....	39
3.4.2.1. Les carbohydrates.....	39

3.4.2.2. Les protéines et les acides aminés.....	40
3.5. Extraction des composés phénoliques totaux.....	40
3.5.1. Extraction solide-liquide (ESL).....	40
3.5.2. Fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par Extraction liquide-liquide (ELL).....	41
3.6. Analyses quantitative des composés phénoliques par spectrophotométrie (UV-Visible).....	43
3.6.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	43
3.6.1.1. Principe.....	43
3.6.1.2. Expression des résultats.....	43
3.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FT).....	44
3.6.2.1. Expression des résultats.....	44
3.6.3. Dosage des tannins condensés (TC).....	44
3.6.3.1. Principe.....	44
3.6.3.2. Expression des résultats.....	45
3.7. Identification des composés phénoliques par HPLC-PDA.....	45
3.7.1. Appareil HPLC-PDA.....	45
3.7.2. Le collecteur (Fraction Collector III).....	45
3.7.3. Conditions opératoires.....	46
3.7.4. Analyse qualitative et quantitative.....	47
4. Résultats et discussion	49
4.1. Enquête ethnobotanique.....	49
4.2. Identification de la plante	50
4.3. Etude phytochimique.....	51
4.3.1. Le criblage phytochimique.....	51
4.3.2. Extraction des flavonoïdes et détermination du rendement de l'extraction.....	52
4.3.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques (PPT, FT, TC).....	53
4.3.4. Caractérisation phytochimique des composés de <i>Lycium halimifolium</i>	55
4.3.5. Analyse des profils des chromatogrammes.....	61

CHAPITRE III : CARACTERISATION DE L'AFLATOXINE B1 ET ETUDE DEL'ACTIVITE BIOLOGIQUE *IN VITRO*

1. Introduction.....	62
2. Synthèse bibliographique.....	63
2.1. Contamination des arachides.....	63
2.2. Conditions de production des aflatoxines par les <i>Aspergillus</i>	63
2.3. Impact des aflatoxines	64
2.3.1. Impact sur la santé.....	64
2.3.2. Impact sur l'économie.....	64
2.4. Lutte contre l'aflatoxine et la décontamination	65
2.4.1. Procédés physiques.....	65
2.4.1.1. Traitement thermique.....	65
2.4.1.2. Irradiation.....	65

2.4.1.3.Extraction.....	65
2.4.1.4.Adsorption.....	66
2.4.2. Procédés biologiques.....	66
2.4.3. Procédés chimiques.....	66
2.4.3.1.Traitement à l'ammoniaque.....	66
2.4.3.2.Bisulfites.....	66
2.4.3.3.Les antioxydants.....	67
3. Matériel et méthodes.....	68
3.1.Test de l'activité antifongique.....	68
3.1.1. Technique de dilution en milieu solide.....	68
3.1.2. Technique de dilution en milieu liquide.....	69
3.1.2.1.Détermination des CMI.....	69
3.1.2.2.Détermination des CMF et CFS.....	69
3.2.Evaluation de l'activité antimycotoxinogène.....	70
3.2.1. Activité mycotoxinogénèse.....	70
3.2.1.1.Préparation de la suspension sporale.....	70
3.2.1.2.Fermentation liquide.....	70
3.2.1.3.Détermination du poids de mycélium.....	70
3.2.1.4.Extraction d'Aflatoxine B1.....	71
3.2.1.5.Séparation chromatographique.....	73
3.2.1.6.Analyse qualitative et quantitatives de l'aflatoxine B1 par HPLC-PDA.....	74
3.2.1.6.1. Appareil HPLC-PDA.....	74
3.2.1.6.2. Le collecteur (Fraction Collector III).....	74
3.2.1.6.3. Le standard d'aflatoxine B1.....	74
3.2.1.6.4. Condition opératoire.....	74
3.2.2. Activité antimycotoxinogénèse.....	75
3.2.3. Détermination du poids de mycélium et la détection l'aflatoxine B1 par CCM et HPLC-PDA.....	75
3.3.Autres activités.....	76
3.3.1. Test de l'activité antimicrobienne.....	76
3.3.1.1.Les micro-organismes étudiés.....	76
3.3.1.2.Le principe.....	76
3.3.2. Test de l'activité antioxydante.....	77
3.3.2.1.Effet capteur du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH).....	77
3.4.Analyse statistique.....	78
4. Résultats et discussions.....	79
4.1.Taux d'inhibition et détermination du CMI, CMF, CFS.....	79
4.2.Evaluation de l'activité antimycotoxinogène.....	81
4.2.1. Activité mycotoxinogénèse.....	81
4.2.2. Production de l'Aflatoxine B1 par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu submergé.....	83
4.2.3. Analyse de l'aflatoxine B1 par HPLC-PDA.....	85
4.2.4. Activité antimycotoxinogénèse.....	87
4.2.4.1.Détermination du poids de mycélium.....	86
4.2.5. Evaluation de l'effet antimycotoxinogénèse par l'analyse chromatographique.....	88
4.3.Autres activités biologiques.....	92
4.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions de <i>Lycium halimifolium</i>	92
4.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	95

4.3.2.1.Effet capteur du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH).....	95
---	----

Chapitre IV : Etude de l'effet antihépatotoxique

1. Introduction.....	97
2. Synthèse bibliographique.....	98
2.1 Anatomie du foie.....	98
2.2.Toxicité de l' aflatoxine B1.....	99
2.2.1. La toxicité aiguë d'AFB1.....	99
2.2.2. Toxicité chronique d'AFB1.....	99
2.3.Aflatoxicose et le cancer du foie.....	100
2.4.Le stress oxydatif.....	101
2.5.Les antioxydants.....	102
2.5.1. Systèmes enzymatiques.....	102
2.5.2. Le superoxydedismutase.....	102
2.5.3. La catalase.....	102
2.5.4. Les glutathions peroxydases et réductases.....	102
2.5.5. Systèmes non enzymatiques.....	103
3. Matériel et Méthodes.....	104
3.1. Etude de l'effet antihépatotoxique des feuilles de <i>Lycium halimifolium</i> Mill.....	104
3.1.1. Choix et préparation des animaux.....	104
3.1.2. Traitement des animaux et données expérimentales.....	104
3.1.3.Prélèvement sanguin.....	105
3.1.4.Sacrifice des animaux.....	105
3.1.5.Dosage des marqueurs de l'hépatotoxicité.....	105
3.1.6. Dosage des paramètres du stress oxydatif.....	106
3.1.6.1. Préparation de cytosol des hépatocytes.....	106
3.1.6.2. Évaluation de l'activité enzymatique de la catalase.....	106
3.1.6.3.Évaluation de la peroxydation lipidique.....	107
3.1.6.4. Dosage de glutathion hépatique (GSH).....	108
3.1.7. Etude histologique.....	108
3.1.7.1. Préparation des blocs.....	108
3.1.7.2. Réalisation des coupes et coloration.....	109
3.2. Analyse statistique.....	109
4. Résultats et discussion.....	110
4.1. L'étude de l'effet antihépatotoxique.....	110
4.1.1. Signes de toxicité.....	110
4.1.2. Évolution du poids corporel des souris.....	110
4.1.3. Poids du foie.....	112
4.1.4. Effet des fractions sur les paramètres de l'hépatotoxicité.....	113
4.1.5. Effet des fractions sur les marqueurs du stress oxydative.....	116
4.1.6. Analyse histologique.....	119

Conclusion Générale et perspectives.....123

Résumé

Abstract

Références

Annexe

Introduction Générale

Les maladies d'origine alimentaire constituent à l'heure actuelle l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. Leurs répercussions sur la santé et l'économie mondiale sont de plus en plus reconnues. Ces maladies sont causées par divers agents entre autre les microorganismes pathogènes.

En plus des virus et des bactéries pathogènes, les champignons toxinogènes constituent un danger réel pour la santé de l'homme et de l'animal par la sécrétion de substances hautement toxiques au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments d'origine végétale ou animale. Ces substances qu'on le nomme sous le nom des mycotoxines.

Les mycotoxines ont des structures chimiques et effets toxiques très variés, elles attirent l'attention du monde entier en raison de leurs effets néfastes sur la santé de l'homme et de l'animal (hépatotoxique, cancérigène, immunotoxique, néphrotoxique, hématotoxique, neurotoxique) et altèrent le fonctionnement des organes de reproductions (Cast, 2003). En outre, les mycotoxines se retrouvent accumulées dans le mycélium, les spores fongiques, adsorbées dans les poussières et sont transportées également sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques. Ce qui constitue une autre voie d'exposition pour l'homme par inhalation (Miller, 1992; Jarvis et Miller, 2005). Parmi les aflatoxines les plus puissants et les plus toxiques ; l'aflatoxine B1 qui est une toxine hautement cancérigène produite par le champignon *Aspergillus flavus*. Elle a été associée au cancer du foie, à la croissance retardée, à un retard de croissance chez les enfants et à l'affaiblissement du système immunitaire. À des niveaux élevés de concentration, l'exposition aux aflatoxines peut provoquer des hémorragies, des œdèmes, et même la mort immédiate. Elles peuvent être aussi à la base d'énormes pertes économiques à l'agriculture et aux industries agroalimentaires

Au vu de ces gigantesques problèmes sanitaires et pertes économiques dont les mycotoxines sont la cause ; un grand intérêt leur est actuellement accordé à travers le monde. Pour garantir ainsi la santé des consommateurs, des méthodes basées sur des procédés physiques, chimiques et biologiques ont été testées principalement pour la détoxification des produits alimentaires (Niderkorn *et al.*, 2007).

Malheureusement, et jusqu'à présent, il n'existe pas de procédés de décontamination fiables permettant de retirer la mycotoxine sans dénaturer le produit. Il est donc nécessaire d'initier

des recherches plus poussées visant à trouver les solutions innovantes en vue de répondre aux questions souvent négligées de contamination et exposition de l'aflatoxine à l'échelle mondiale. Une stratégie de prévention de la contamination par les mycotoxines est donc indispensable.

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, comporte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et d'autre part, pour la protection de l'économie du pays.

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser de nombreux composés chimiques (polyphénols, saponines, alcaloïdes,...) de propriétés physico-chimiques très différentes et qui présentent une large variété d'activités biologiques (antimicrobienne, antitumorale, antivirale, antioxydante...). Il est actuellement reconnu que les plantes constituent une source importante de molécules bioactives. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives pour lesquelles il convient de préciser les propriétés et valider les usages.

Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de notre patrimoine végétal et la recherche des extraits des plantes qui présentent des propriétés biologiques intéressantes font l'objet des axes de recherche actuel.

Le *Lycium halimifolium* Mill est une plante médicinale de la famille de Solanaceae connue par sa puissance antioxydante de ses baies. Et malgré les diverses études sur l'utilisation de ses baies dans le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle, peu de travaux ont été réalisés sur ses feuilles. Les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill font donc l'objet de notre étude phytochimique et biologique et plus particulièrement l'effet antimycotoxinogène et antihépatotoxique.

La démarche poursuivie pour la réalisation de ce modeste travail passe par quatre chapitres, le **premier** est dédié à l'isolement et l'identification d'une souche de moisissure à partir des grains d'arachides produisant l'aflatoxine B1, qui servira de support pour le reste de ce travail. Le **second** présente une étude ethnobotanique suivi par une étude phytochimique

caractérisée par des analyses qualitatives et quantitative de différentes fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill. **Le troisième** est consacré à la recherche *in vitro*, les effets antifongiques et antimycotoxinogène sur la souche fongique sélectionnée productrices d'aflatoxines B1, cette partie sera associée à d'autres activités biologiques. Enfin, **le quatrième chapitre** est orienté vers la recherche *in vivo* de l'effet préventif et/ou thérapeutique des fractions de feuilles de *Lycium halimifolium* Mill vis-à-vis de la toxicité hépatique de l'aflatoxine B1.

En sommes, les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité ont été dégagées.

Chapitre I

Mycètes Mycotoxinogènes

1. Introduction

Un grand nombre d'espèces de moisissures appartenant, principalement, aux trois genres très communs de mycètes en l'occurrence, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, présents dans l'air ambiant, le sol, sur les cultures, sont capables, en se développant sur certains substrats tel que l'arachide, de synthétiser et d'excréter des toxines. Ces toxines qualifiés de mycotoxines ; sont très toxiques pour l'homme et les animaux, celles les plus couramment rencontrées, et faisant l'objet d'une surveillance régulière, sont les aflatoxines. En effet, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé les aflatoxines parmi les substances cancérogènes.

La mycotoxinogénèse est un phénomène d'une grande complexité, dont les conditions optimales dépendent d'une combinaison de plusieurs facteurs.

En Algérie, des études récentes réalisées sur des denrées alimentaires commercialisées ont mis en évidence la présence d'aflatoxines dans les arachides (Riba, 2010 ; Guezlane-Tebibel, 2013). De même, Plusieurs travaux ont porté sur l'identification des moisissures et de la toxicité de leurs mycotoxines dans le domaine alimentaire (Bouhet et Oswald 2005 ; Makun *et al.*, 2010).

L'objectif visé dans ce chapitre, est l'isolement d'une souche de moisissure à partir des grains d'arachides produisant de mycotoxines ; plus précisément l'aflatoxine B1, et son identification moléculaire. La souche sélectionnée servira de support pour le reste de ce travail.

2. Revue bibliographique

2.1. Moisissures mycotoxinogènes

Les moisissures sont des champignons filamenteux souvent multicellulaires, largement répandues dans la nature, et peuvent être observés à divers endroits (atmosphère, sol, eau, végétaux et déchets organiques, etc.), et plus particulièrement sur les denrées alimentaires entreposées, stockées depuis un certain temps (Marie *et al.*, 2002 ; Tabuc, 2007). Le terme "moisissure" désigne l'ensemble des champignons microscopiques qui ont de l'importance dans l'industrie humaine et dans l'environnement, de façon bénéfique ou néfaste (Leyral et Vierling, 2001 ; Nguyen, 2007).

Les champignons toxiques produisent un certain nombre des mycotoxines, très toxiques pour l'homme et les animaux, ce qui les qualifie de moisissures mycotoxinogènes, leur présence est fortement dépendante de nombreux facteurs (Cahagnier, 1998 ; Guezlane-tebibelet *al.*, 2016).

2.2. Facteurs influençant la toxinogénèse

La mycotoxinogénèse, est la synthèse et l'excrétion des mycotoxines, c'est un phénomène d'une grande complexité. Cependant, les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique. Ainsi, nous pouvons distinguer les facteurs intrinsèques qui sont liés à la souche fongique elle-même et les facteurs extrinsèques qui se constituent de l'ensemble des conditions écologiques (Moreau, 1994 ; D'Mello, 1997)

2.2.1. Facteurs extrinsèques

Les facteurs de l'environnement qui contrôlent le développement de la toxinogénèse chez moisissures sont nombreux à savoir la teneur en eau, l'humidité relative, le pH, la température ambiante, la composition du substrat en éléments nutritifs et sa richesse en graisses ou en azote et la compétition entre les différents micro-organismes (Tabuc, 2007 ; Guezlane-tebibelet *et al.*, 2016).

2.2.2. Facteurs intrinsèques

Concernant la nature de la souche, certaines moisissures sont toxigènes, en revanche, d'autres ne le sont pas. De plus au sein d'une même espèce toxigène, certaines souches sont fortement productrices de toxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindres. La toxinogénèse d'une moisissure peut dépendre du stade de développement de la souche productrice (Castegnaro, 1999 ; Abdellah, 2004 ; Tabuc, 2007).

2.3. Genre *Aspergillus*

Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embranchement des Ascomycotina par leur mode de reproduction sexué. La monographie de Raper et Fennell, « the genus *Aspergillus* » reconnaît plus de 132 espèces réparties en 3 grandes divisions en fonction de la présence ou non de métules. Ce n'est qu'en 1985 que Samson et Pitt ont proposé la création de sous-genres et de section.

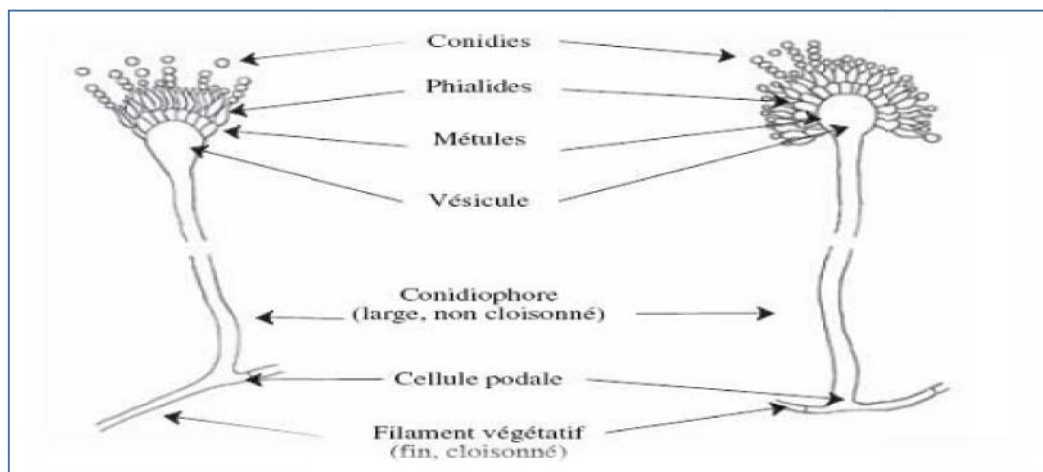


Figure 1. Caractères morphologiques des *Aspergillus* (Botton *et al.*, 1990).

La plupart des *Aspergillus* sont saprophytes, ils se développent dans le sol et les détritux, dans les composts et sur les végétaux malades et morts. Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons, mais ils sont aussi présents sur la surface des graines. Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent évoluer et devenir des parasites. Les champignons appartenant à ce genre sont responsables de maladies chez l'homme et les animaux (aspergillose pulmonaire, allergies ou mycotoxicoses). Cependant ils sont aussi capables de produire des enzymes, des acides organiques et des pigments utiles en alimentation et en industrie (Schuster *et al.*, 2002).

Selon Klich, (2002) la classification de l'*Aspergillus* est comme suit :

Règne : *Mycota*

Embranchement : *Eumycota*

Sous-embranchement : *Ascomycotina*

Classe : *Euascohyetes*

Ordre : *Eurotiales*

Famille : *Trichocomaceae*

Genre : *Aspergillus*

2.4. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus, moisissure de couleur vert jaune à vert olive, caractérisée par des conidiophores nettement rugueux et incolores, des vésicules globuleuses ou subglobuleuses de 25 à 45 µm de diamètre, généralement bisériées, des phialides verdâtres, de 6-10 x 4.0-5.5 µm, des conidies subsphériques de 3 à 6 µm, vert pâle et légèrement rugueuses. C'est une espèce à prédominance tropicale et subtropicale, peut coloniser de nombreux substrats, fréquemment rencontrés dans le sol, les produits végétaux en décomposition, les fourrages, les grains et semences en stockage, les aliments pour animaux, les dérivés de céréales, etc. *A. flavus* élaborent divers métabolites toxiques, mais surtout des aflatoxines, notamment l'aflatoxine B1 qui est l'un des plus puissants hépato-carcinogènes connus à l'heure actuelle (Tabuc, 2007).

2.5. Mycotoxines

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire des moisissures, de faible poids moléculaire, élaborés par des moisissures appartenant principalement aux genres ; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria* (Galtier, 2005 ; Guezlane-tebibel *et al.*, 2016). On distingue parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agroalimentaire et sanitaire, les aflatoxines, l'ochratoxine A, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone, les trichothécènes et notamment le déoxynivalénol et la toxine T-2 (Galtier, 2005 ; Bennett, 2003).

L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent, des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine,

roquefortine,sporodesmine), des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone), des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) ou encore des dérivés d'acides gras (fumonisines, alternariol)(Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Dans les conditions arides, le stress de la sécheresse peut entraîner la fissure des gousses (arachides, maïs) et l'infiltration des spores aboutissant ainsi à une importante accumulation d'aflatoxines (Ellis *et al.*, 1993 ; Giorni *et al.*, 2008 ;Streit, 2012). L'aflatoxinogénèse par *A. flavus* peut avoir lieu dans une température situant entre 12°C et 42°C, avec un optimum se trouvant entre 25°C et 30°C et une activité de l'eau estimée (a_w) entre 0.84- 0,99 (Pitt et Miscamble, 1995 ;Belli, 2004 ; Giorni *et al.*, 2008).

2.6. Les aflatoxines (AFs)

2.6.1. Généralités

Les aflatoxines sont un groupe de métabolites secondaires toxiques, produits principalement par certaines souches d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Kibje, 2015). Les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 respectivement) sont les quatre toxines principales parmi au moins 16 toxines. *Aspergillus flavus* produit les aflatoxines B1 et B2 avec d'autres composés toxiques à savoir :Acides cyclopiazonique, acide kogique, acide -nitropropionique, aspertoxine, aflatrème et l'acide aspergillique (Huwig *et al.*, 2001; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Coppock and Christian, 2007 ; Huffman *et al.*, 2010). Les aflatoxines AFM1 et AFM2 sont les métabolites des aflatoxines AFB1 et AFB2, issus de leur hydroxylation dans le foie des animaux exposés. Ces métabolites représentent un danger en terme de santé publique car ils sont excrétés dans le lait, se fixent aux caséines et persistent dans les produits laitiers (Marienet *al*, 1987).

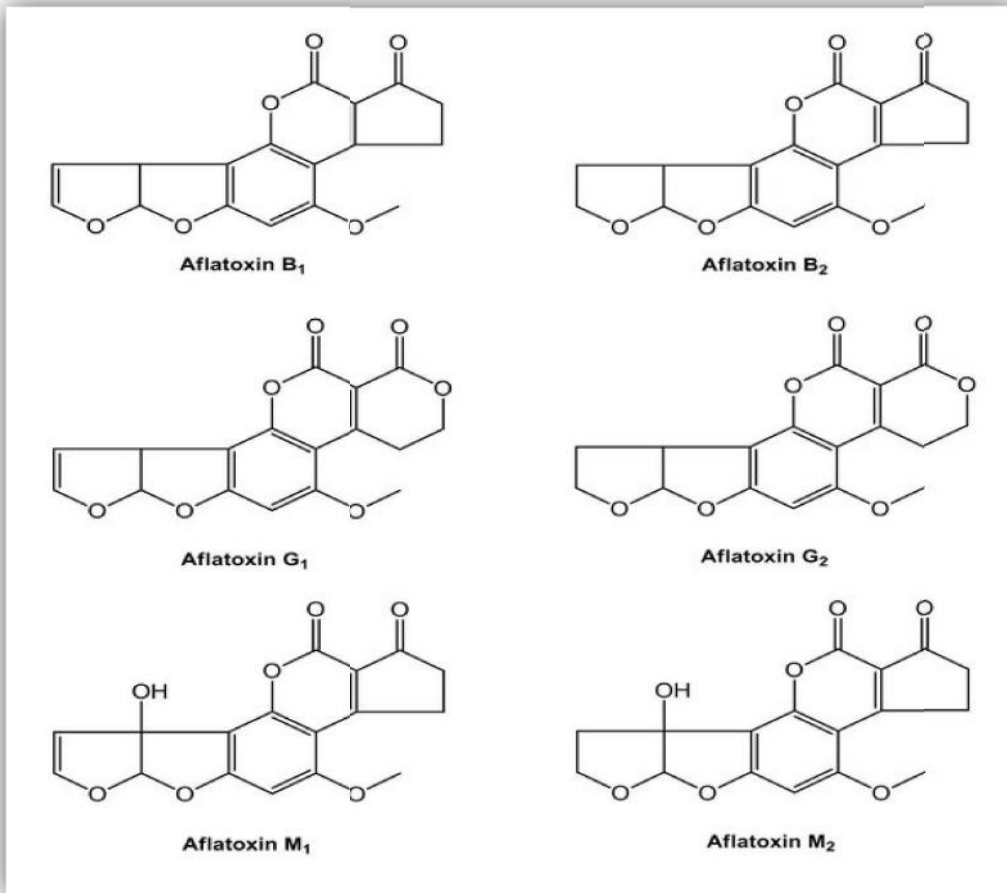


Figure 2. Structure des aflatoxines.

2.7. Aflatoxine B1

Une des plus célèbres mycotoxines et possédant le profil toxicologique le plus sérieux, l'aflatoxine B1 (AFB1) dont le nom chimique est 6-Méthoxydifurocoumarone 2,3,6a,9a - tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta-[c]furo [3',2':4,5] furo [2,3-h] [1] benzopyran-1,11-dione (Toffa, 2015).

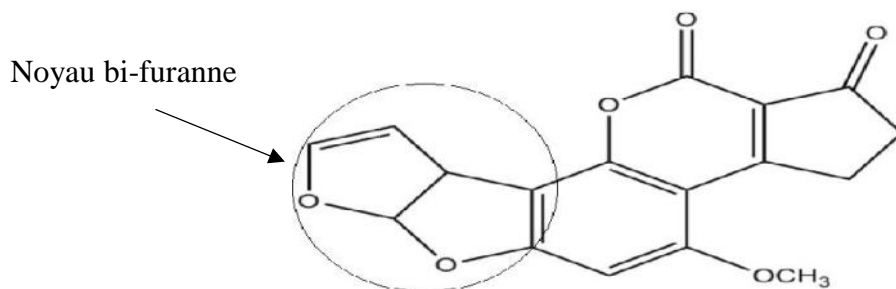


Figure 3. Structure chimique de l'aflatoxine B1.

L'AFB1 est un composé thermorésistant stable même à des températures de 250 °C pendant 30 minutes à l'état cristallisé, leur poids moléculaire est de 312. L'aflatoxine en présence des rayons UV et une fluorescence bleue (AFB1 et AFB2) ou verte (AFG1 et AFG2). Par contre, l'AFM1 émet une fluorescence bleue violette, elles sont très solubles dans les solvants organiques de polarité moyenne (CHCl₃, CH₃OH, DMSO), renferment une double liaison en position 8-9 qui les rendent potentiellement cancérigènes (Abdellah, 2004 ; Toffa, 2015).

2.7.1. Biosynthèse de l'aflatoxine B1

Les aflatoxines dérivent de l'acétyl-CoA issu du métabolisme primaire et dépend fortement des conditions chimique et physique de croissance, c'est-à-dire, de la composition du substrat, de la température, du pH, de l'activité de l'eau et de la combinaison particulière de différents paramètres qui peuvent inhiber ou activer complètement la biosynthèse de ces aflatoxines (Ellis *et al.*, 1993; Giorni *et al.*, 2008 ;Redouane-salah, 2016).

La biosynthèse des aflatoxines débute par la conversion des malonyl-CoA en une polycétone noranthrone par deux acides gras synthases (Fas-1 et Fas-2) et une polycétone synthase PKS. La conversion de la noranthrone en acide norsolorinique (NOR), le premier intermédiaire stable, est probablement, assurée par la monooxygénase CypA et la déhydrogénase NorB. Le NOR peut être ensuite transformé en averantine (AVN) par déhydrogénase Nor-1 ou NorA. Quelques étapes de conversion d'AVR en versicolorine B (VERB) ne sont pas encore établies. Cette conversion est probablement catalysée par les enzymes CypX, MoxY et AvfA. La versicolorine A est transformée en diméthylsterigmatocystine (DMST) par une ketoreductase Ver1 et un cytochrome P450 monooxygénase VerA. L'étape finale est la conversion d'O-méthyl-sterigmatocystine (OMST) ou dihydro-O-méthylsterigmatocystine (DHOMST) en aflatoxines B1, B2, G1 et G2 en présence de l'enzyme NADPH-dépendant monooxygénase (Dao, 2005).

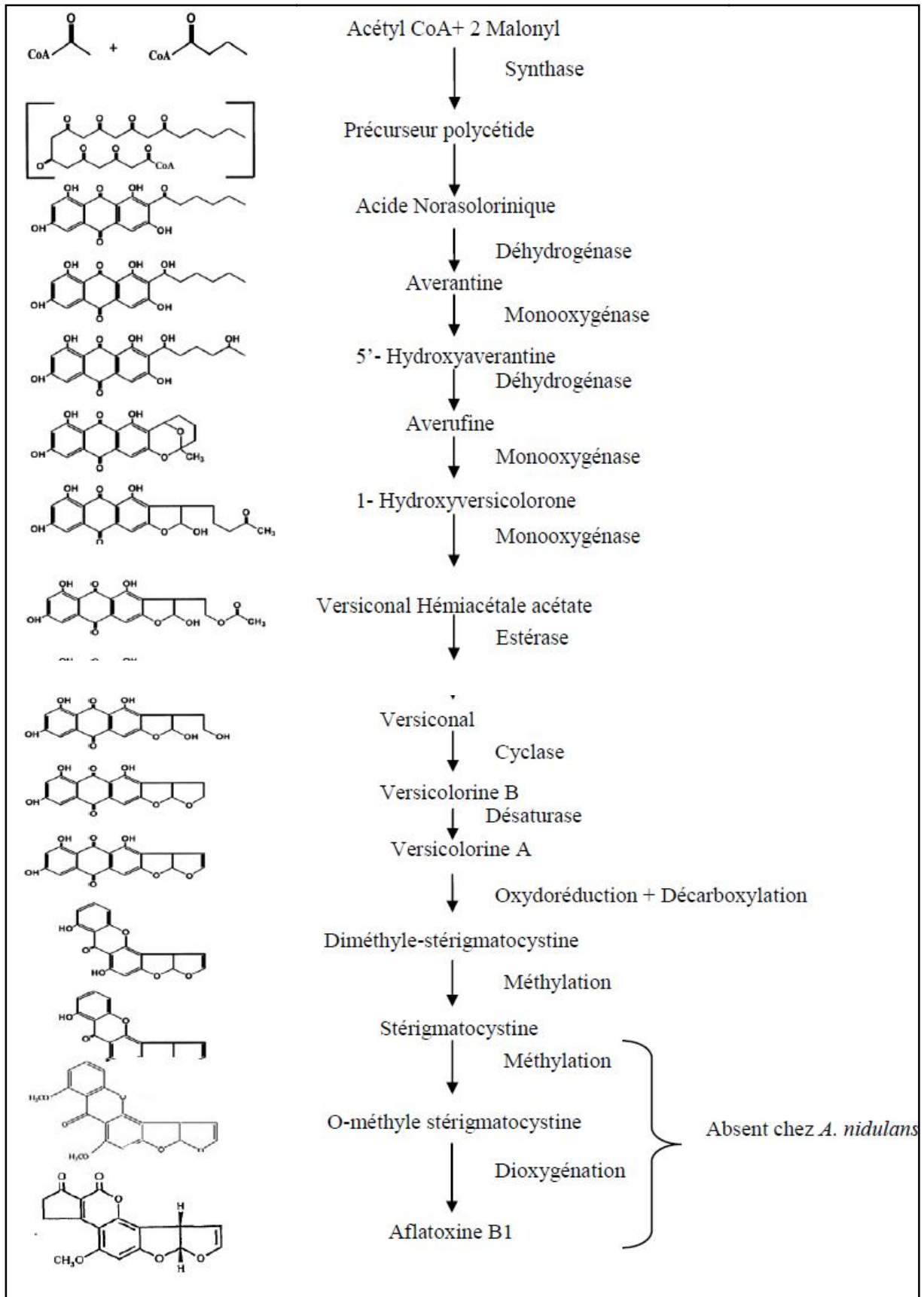


Figure 4. Voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1 de l'*A. flavus* (Wilkinson *et al.*, 2004).

2.7.2. Métabolisme de l'aflatoxine B1

La pénétration dans l'organisme de l'AFB1 peut avoir lieu par voie orale et trachéale, l'absorption est rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle dans la partie duodénale (Castegnaro *et al.*, 1999; Dao, 2005 ; Magnusson, 2013 ; Kibje, 2015). L'AFB1 peut subir des réactions de biotransformations de phase I (oxydo-réduction) (ex: AFM1) et de phase II (conjugaison) (ex: GSH-AFB1).

L'AFB1 rejoint le foie par la veine porte, les enzymes cytochrome P450 (CYP) (incluant CYP1A2, CYP3A4 et CYP2A6) dans le foie et d'autres tissus convertissent l'AFB1 aux époxydes (AFB 1-8,9-exo-époxyde), et (AFB1-8,9-endo-époxyde) et à AFM1, AFP1, AFQ1, et sa forme réduite aflatoxicol. Parmi les époxydes, l'AFB1-8,9-exo-époxyde (et non l'AFB1-8,9-endo-époxyde) peut former des liaisons covalentes avec l'ADN et à l'ARN en position N7 de la guanine, ayant pour conséquence l'altération de la synthèse d'acides nucléiques (transcription, blocage de l'ARN polymérase II) et de la synthèse peptidique (traduction, blocage de la synthèse des ARNr, ARNt et ARNm) (Figure 5) (Magnusson, 2013). L'AFB1 8,9-époxyde peut aussi se lier à des protéines (protéines nucléaires, liaison aux histones H3) et en modifier la structure et les fonctions comme l'altération du transport des électrons et de la respiration cellulaire (cytochromes b et c). De plus, l'époxyde AFB1-8,9 (active) peut interférer avec le fonctionnement normal des cellules nerveuses en formant des adduits d'ADN, des adduits de protéine, des facteurs de stress oxydatifs, une apoptose dirigée mitochondriale des cellules nerveuses ainsi que l'inhibition de leur synthèse de protéine, d'ARN et l'ADN (Brown, 2009; Ezekiel *et al.*, 2011). En outre, AFB1, AFM1 peut également être activé pour former AFM1-8,9-époxyde qui se lie à l'ADN résultant des adduits en AFM1-N7-guanine. Ces adduits de guanine et de lysine sont notés pour apparaître dans l'urine. Il a été reporté également que l'AFB1 est capable d'induire la mutation du codon 249SER du gène TP53, cette dernière étant le résultat directe de l'effet mutagénique de l'AFB1 (Villar *et al.*, 2012).

La biotransformation des groupements fonctionnels de l'AFB1 entraîne une réduction de la toxicité lors d'hydroxylations AFP1, AFQ1 et l'aflatoxicol, devenant inactifs, plus hydrophiles et sont excrétés tels quels dans l'urine sous forme conjuguée au glutathion, à l'acide glucuronique et au sulfate (IARC, 2002; Do, 2007). Ceci est dû, entre autre, au fait que l'AFB1, au niveau du plasma, se fixe sur l'albumine sur le même site que la phénylbutazone,

Ce mode de détoxification est la voie majeure d'excrétion chez un grand nombre d'espèces animales (Castegnaro *et al.*, 1999 ; Wild et Turner ,2002 ; Klin *et al.*, 2002).

- Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie (adapté de Swick 1984 et Neal 1998).

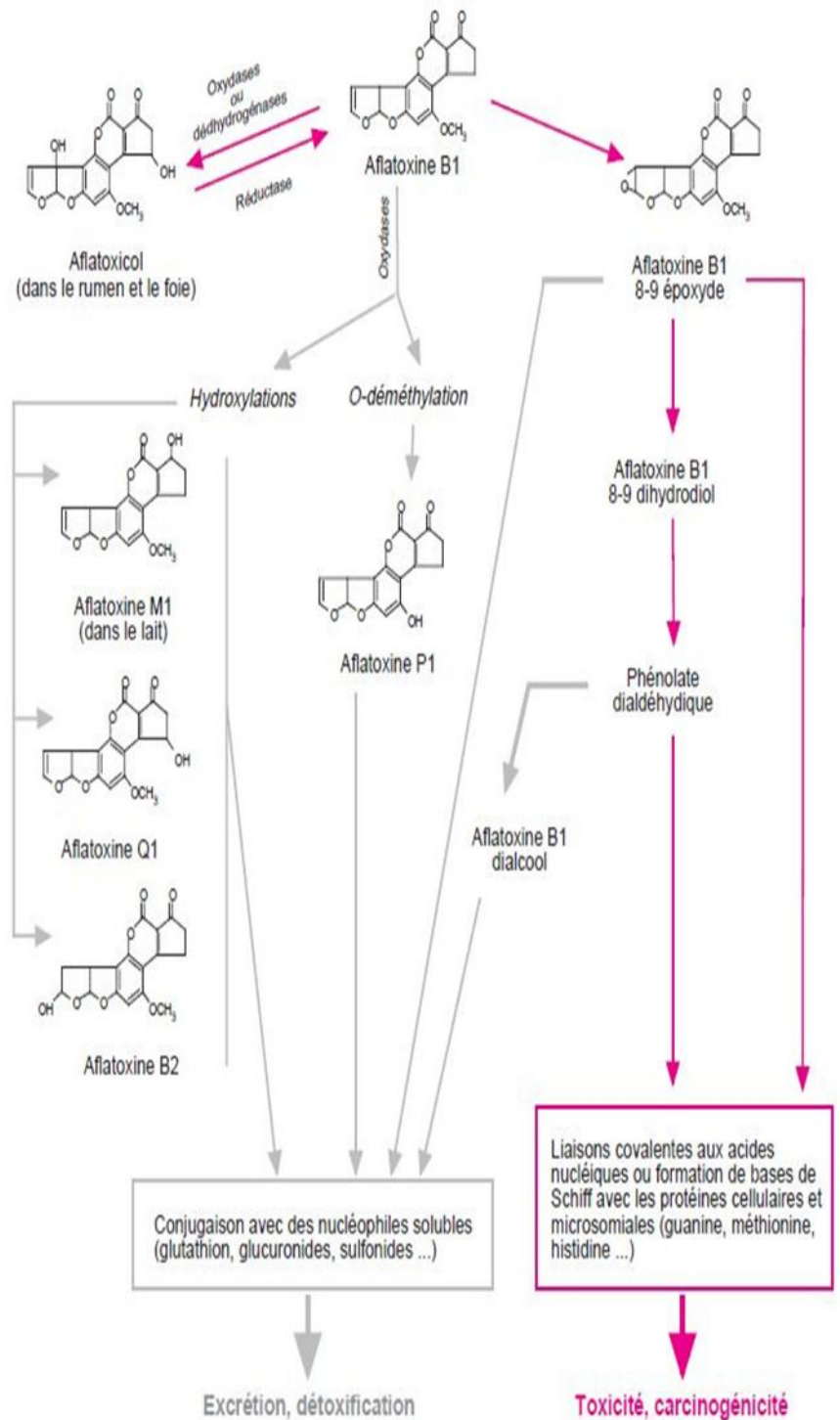


Figure 5. Voie métabolique d'AFB1 (Swick, 1984 ; Neal,1998).

3. Matériel et méthodes

Cette partie a été réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (**LaMyBAM**), l'identification moléculaire de l'isolat fongique a été réalisée au Laboratoire des Microorganismes et des Biomolécules Actives (**LMBA**), Tunisie.

3.1. Echantillonnage

Les arachides utilisées pour cette étude ont été choisies parmi les céréales cultivées dans la commune de Berrihane (wilaya d'El Tarf) située à une altitude de 8m, une latitude : 36.8372, une Longitude: 8.12385, 36° 50 14 Nord, 8° 7 26 Est. Cette région se caractérise par un climat humide et une température avoisinant la température optimale de la sécrétion de l'aflatoxines. La récolte est effectuée durant le mois de juin 2013.

3.2. Isolement des moisissures

L'isolement du champignon toxigène est effectué par la désinfection superficielle des petits fragments des grains d'arachides endommagés et ce, par trempage dans l'éthanol absolu pendant cinq minutes. Les pièces sont, ensuite, rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile, afin d'éliminer les contaminants de l'air (Benhamou *et al.*, 1997). Un échantillon d'une cinquantaine de gousses d'arachides issues de la campagne agricole 2013 a été mouillé avec de l'eau distillée stérile et laissé à la température ambiante (27 °C à 34 °C) dans des boîtes de Pétri pendant 7 jours. Les gousses d'arachides ont été ouvertes mais les graines et leurs coques ont été mouillées ensemble (Ouattara, 2011).

3.3. Purification

Partant du consortium de champignons poussés, une purification des souches d'intérêt (*Aspergillus*) a été faite. Pour cela des repiquages successifs en points par épuisement des champignons poussés ont été effectués sur le Potatose dextrose agar (PDA), ce milieu ralentit le développement des moisissures envahissantes tels que les *Mucor* et les *Rhizopus*, et permet d'isoler celles appartenant à d'autres genres *Aspergillus*. La colonie parfaitement isolée, peut être ensuite, prélevée et transférée toujours au moyen d'une anse de repiquage sur

le même milieu mais dans de nouvelles boîtes de Pétri (Badran et Zulfiqar, 2012). L'incubation de toutes les boîtes est effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes, les dernières colonies poussées sur les points de repiquages successifs par épuisement ont constitué les souches pures. La croissance bactérienne a été inhibée par l'addition de chloramphénicol aux milieux de culture à une concentration de 5 mg/l pour éviter la contamination (Botton *et al.*, 1999).

3.4. Conservation des moisissures

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les isolats en tube sur gélose inclinée PDA, les cultures sont incubées pendant 3 à 7 jours à 28°, pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Botton *et al.*, 1990; UI-Haq *et al.*, 2002).

3.5. Identification de l'isolat fongique

L'identification morphologique de l'isolat fongique sélectionnée fait essentiellement appel aux caractères culturels et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure (Botton *et al.*, 1990), elle est effectuée par l'ensemble de tests préliminaires : observation macroscopique, microscopique, et l'étude moléculaires.

3.5.1. Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus* ou d'un autre genre en fonction de l'aspect morphologique de la taille (petite, moyenne, grande), de la forme de la colonie (ronde, irrégulière, etc.), de la transparence, de l'élévation de la colonie, de type de la colonie et le relief (Camille, 2007).

3.5.2. Observation microscopique

3.5.2.1. Observation à l'état frais

Dans des conditions d'hygiène et d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine

stérile, un prélèvement de la colonie identifié est apporté et dissocié dans la goutte d'eau physiologique stérile, ensuite, recouverte par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air, l'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) puis à immersion (X100). Cette technique permet l'observation des moisissures vivantes et la détermination de leur morphologie (Singleton, 2005).

3.5.2.2. *Observation par coloration au bleu de méthylène*

Cet examen repose sur la méthode classique suivante ; les frottis utilisés sont étalés à l'aide d'une anse sur des lames en verre propres. Les lames sont ensuite séchées à l'air, à proximité d'un bec bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois sur la flamme. Les frottis préparés sont colorés pendant 2 minutes au bleu de méthylène puis ils sont décolorés par lavage à l'eau du robinet, séchés par le papier filtre et examinés au microscope jusqu'à l'objectif à immersion (GX100) (Guiraud, 1998).

3.5.3. **Etude moléculaire**

L'étude moléculaire de l'isolat fongique a été réalisée au Laboratoire des Microorganismes et des Biomolécules Actives (**LMBA**), Tunisie, elle consiste à confirmer l'identification de l'isolat fongique sélectionné par l'utilisation des amorces universelles *ITS1*, *ITS4* pour le gène *ITS*. La détermination de l'identité d'un microorganisme nécessite la réalisation de plusieurs étapes, à savoir : L'extraction d'ADN ; l'amplification du gène désiré par PCR ; purification du produit de la PCR ; le séquençage du gène étudié et le traitement des séquences.

3.5.3.1. *Extraction de l'ADN fongique*

Des tubes d'ependorff de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium fongique, un volume de 500 µl de tampon de lyse est ajouté au broyat. Après homogénéisation du mélange avec une pince en bois, le mycélium est mis en incubation pendant 30 minutes à 1 heure au bain-marie à 65°C. Les protéines sont éliminées par un traitement au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (volume égal à celui du tampon de lyse). Après homogénéisation du mélange et centrifugation (15 min à 13000g), la phase supérieure aqueuse est récupérée (environ 400µl) et l'ADN est précipité sélectivement en présence de 10% (40 µl) d'acétate de sodium (3 M à pH 8) et avec un volume de 0,54 (216 µl) d'isopropanol pour ne pas précipiter les

polysaccharides. Après une nouvelle centrifugation (3min à 12000g), le surnageant est retiré et le culot d'ADN est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 300 µl de tampon TE puis placé à 65°C jusqu'à dissolution complète. L'ADN dissout est traité avec 3 µl de ribonucléase A (concentration finale : 100 µg/ml) pendant 1 heure à 37 °C. L'ADN est ensuite précipité avec 30 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 8) en présence de 600 µl d'éthanol pur (conservé à -20°C), le culot est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 % puis séché au " Speed vac " pendant 15 à 20 min. L'ADN est ensuite repris dans 100 µl de TE, maintenu une nuit à 4°C (pour dissoudre l'ADN) puis conservé à -20.

3.5.3.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La technique de la PCR consiste en une amplification enzymatique *in vitro* d'un segment d'ADN, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires des séquences en 5' et 3' du segment à amplifier. Ce segment est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives. Cette technique est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie thermophile *Thermusaquaticus*. Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C (Mullis et Faloona, 1987). La réaction d'amplification nécessite, outre la présence de l'ADN utilisé comme matrice et la Taq polymérase, l'utilisation de deux oligonucléotides (amorces) qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier, et des déoxynucléotides triphosphates (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) nécessaires à la synthèse de nouveaux brins d'ADN. La réaction d'amplification s'opère au cours d'une succession de cycles de températures sur le mélange réactionnel adéquat. Le cycle d'amplification débute généralement par la dénaturation de l'ADN bicaténaire à amplifier (92°C- 95°C) ensuite Hybridation ou appariement des amorces sur la région complémentaire (varie selon les T_m des amorces) et enfin l'extension ou polymérisation à partir des amorces des brins d'ADN. On se place généralement à 72°C.

Dans le présent travail, la PCR a été adoptée pour amplifier les *ITS* (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs internes transcrits) de l'unité ribosomique de la souche d'intérêt. Deux amorces universelles *ITS1* et *ITS4* ont été utilisées, il s'agit de: ***ITS1*: TCCGTAGGTGAACCTGCGG** (T_m= 58°C) et ***ITS4*: TCCTCC GCTTATTGA TATGC** (T_m= 65°C) (Josef *et al.*, 2004), Le mélange réactionnel de PCR utilisé pour amplifier le gène étudié contenait: 5 µl Tampon de la réaction 10X, 1.5 µl Tampon Mg, 0.3 µl dNTPs

(10 mM) , 0.5 µl *ITS1* (20 pmoles/µl), 0.5 µl *ITS4* (20 pmoles/µl), 17.5 µl H₂O ultra pure, 0.22 µl Taq polymérase, 1 µl ADN. le programme d'amplification de l'*ITS* est le suivant : 95°C pendant 5min, puis 30 cycles de « 95°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1min », et enfin 72°C pendant 15 min.

3.5.3.3. Electrophorèse des acides nucléiques

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel horizontal d'agarose à 1,4% additionné de bromure d'éthidium (1µl/20 ml de gel). Cette électrophorèse se fait dans un tampon TEB (80 mM Tris-HCl pH 8 ; 2,5 mM EDTA ; 89 mM acide borique) pendant 2h 30 à 3h sous 120 volts. Les bandes amplifiées sont visualisées sous UV (312 nm). La taille des différents fragments est déterminée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire. Le séquençage des gènes étudiés est réalisé en utilisant les mêmes amorces décrites ci-dessus.

3.5.3.4. Analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques

Les séquences obtenues sont corrigées et sont déposées dans la banque de donnée «Genbank » et le numéro d'accession est obtenu. La comparaison des séquences avec celles ces bases de données a été réalisée via l'algorithme BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Les alignements des séquences nucléotidiques ont été réalisés grâce au logiciel Chromas (Thompson *et al.*, 1994).

4. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'isolement des souches fongiques à partir des arachides et la sélection de l'isolat le plus performant pour la production des toxines en se focalisant sur la caractérisation moléculaire de l'isolat sélectionné.

4.1. Isolement et purification

L'isolement des moisissures à partir des échantillons d'arachides a permis d'observer deux aspects différents (Figure 6).



Figure 6. Photos de l'isolement des moisissures

La purification des moisissures sur milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) et incubation à l'obscurité pendant sept jours à 25°C a donné seulement deux types de moisissures (Isolat 1 et Isolat 2) qui semblent appartenant au genre *Aspergillus*. En raison de leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et leur pathogénicité, nous avons choisis le premier isolat(**I₁**)(**Figure 7**).

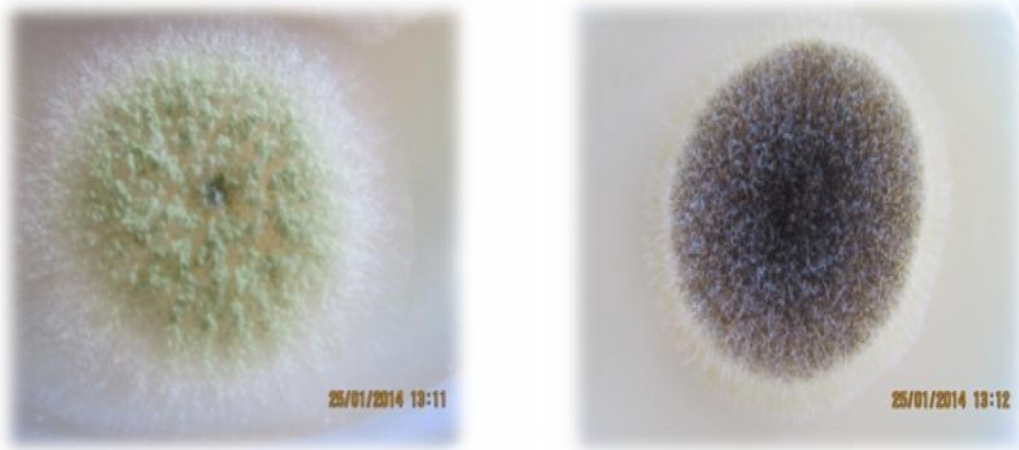


Figure 7.Photos représente la purification des isolats I₁(à gauche) et I₂(à droite).

Tout d'abord, la principale région de production de l'arachide en Algérie est la région de la wilaya d'El Taref. En 2013, cette dernière note une production 15.000 quintaux de cacahuètes dans une superficie de 2.500 ha, d'après la déclaration du directeur des services agricoles (DSA), M.Y. Kourd de la wilaya d'El Taref.

D'après les résultats, notre échantillon d'arachide présente une variété de flore fongiquelimitée, uniquement deux isolats sont observés. Ce résultat corrobore avec plusieurs études qui ont confirmé que les arachides sont des denrées alimentaires fréquemment contaminées par les moisissures, la contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, ou au cours du stockage (Nguyen, 2007 ; Tabuc, 2007 ; Kpatinvoh *et al.*, 2017).En outre, lorsque les conditions environnementales (température et humidité) sont favorables, la dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminante (les arachides, maïs, niébé, riz...) a été reportée dans plusieurs travaux (Le bars et le bars, 1987; Riba *et al.*, 2005 ; Toffa, 2015). Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (Withlow et Hagler, 2001).Ces moisissures ont déjà fait l'objet de plusieurs études à travers le monde, particulièrement en Afrique, où des rapports relatant leurs présences dans les arachides et les effets carcinogènes, mutagènes, hépatotoxiques, tératogènes qu'induisent leurs métabolites secondaires sur les consommateurs sont établis (Bankole and Adebajo, 2003 ; Zinedine *et al.*, 2007).

4.2. Identification de l'isolat sélectionné

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium.

4.2.1. Critères d'identification macroscopique

L'identification de l'isolat sélectionné (**I₁**) a été faite, en premier lieu, par une analyse des critères macroscopiques selon les clés de détermination de Botton *et al.*, (1990).

Les observations sont illustrées dans la figure 8 ci-dessous.

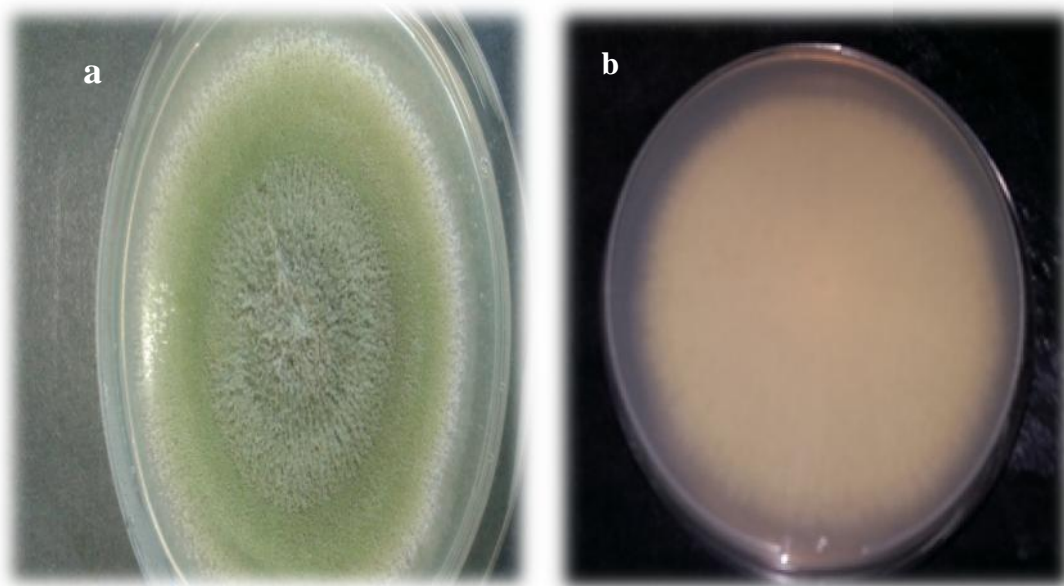


Figure 8. Aspect des colonies de l'isolat sélectionné sur milieu PDA : (a). face ;(b). Revers.

L'étude macroscopique de l'isolat est réalisée par l'observation de la colonie à l'œil nu après 7 jours d'incubation, sur gélose PDA et à température optimal ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). En effet, l'observation a montré que l'isolat **I₁** se développe rapidement (de 2 à 3 jours), la forme des colonies est duveteuses à poudreuses, puis, jaune, ensuite, vert-jaune à vert olive et pouvant

avoir une bordure blanche, plus dense vers le centre. Le revers présente une couleur jaunâtre crème sur le milieu PDA.

4.2.2. Critères d'identification microscopique

L'étude microscopique est portée sur l'observation des structures caractéristiques de la souche fongique sélectionnée (**I₁**), elle s'effectuait sous microscope optique aux grossissements GX40 et GX100. La **figure 9** résume les différents caractères microscopiques observés par différentes techniques.

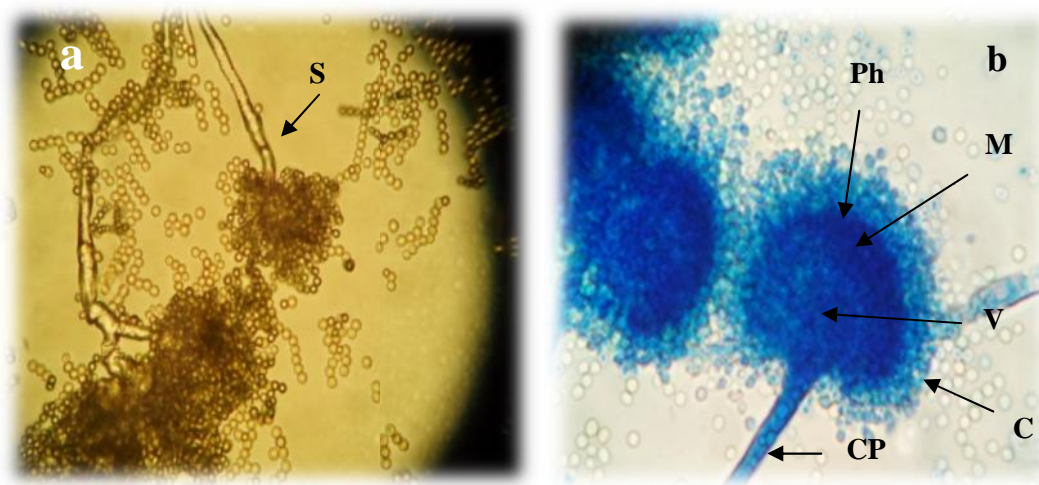


Figure9. Aspect microscopique de l'isolat sélectionné sous microscope optique : (a). à grossissement x40, (b). à grossissement x 100. C: conidies, CP: conidiophore, V: vésicule. M: métule, Ph: phialide, S : septum.

L'étude microscopique de la souche en question, a permis d'observer un mycélium cloisonné, une tête aspergillaire constituée d'une vésicule sphérique, sur laquelle sont formées les phialides portés sur des métules (tête bisériée), chaque phialide produit des conidies globuleuses à subglobuleuses, vert pâle, ainsi, les têtes aspergillaires sont portées sur des conidiophores. D'après Tabuc, (2007) et Pitt et Hocking, (2009), tous ces critères macroscopiques et microscopiques, montrent que cet isolat appartient au genre *Aspergillus* dont l'espèce est *Aspergillus flavus*. Ce résultat corrobore avec celle des travaux réalisés récemment par Houshyarfard *et al.*, (2014), qui ont montré que les grains d'arachides peuvent être contaminés par *Aspergillus*, dont les principales espèces fongiques identifiées sont l'*Aspergillus flavus*, qui est majoritairement isolé de notre échantillon d'arachide, et l'*Aspergillus parasiticus* par contre non identifiée dans notre cas.

Pour confirmer cette identification, une caractérisation moléculaire a été effectuée.

4.2.3. Caractérisation moléculaire de l'isolat

L'étude moléculaire de l'isolat fongique **I₁** a été réalisée au Laboratoire des Microorganismes et des Biomolécules Actives (**LMBA**), Tunisie. Les méthodes les plus intéressantes pour l'identification sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques, des régions *ITS1* et *ITS2* (Hinrikson *et al.*, 2005).

L'identification moléculaire peut permettre une différenciation rapide des différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que celle d'autres moisissures ou levures, pathogènes opportunistes (Paterson *et al.*, 2003; Dial, 2007; Schabereiter-gurtner *et al.*, 2007).

4.2.3.1. Extraction d'ADN

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN de l'isolat d'*Aspergillus flavus* a été vérifié par *Nanodrop 2000*. Les résultats obtenus ont révélé une bonne concentration de l'ADN, $R = (DO260/DO280) = 2$, résultat largement satisfaisant, ce qui a permis son amplification.

4.2.3.2. Amplification de séquence d'ADN- ITS

Les résultats montrent que la bande d'ADN amplifiée de l'*ITS* migre avec une distance équivalente à 600 pb. Le profil de la séquence amplifiée de l'*ITS* est illustré dans la figure 9.

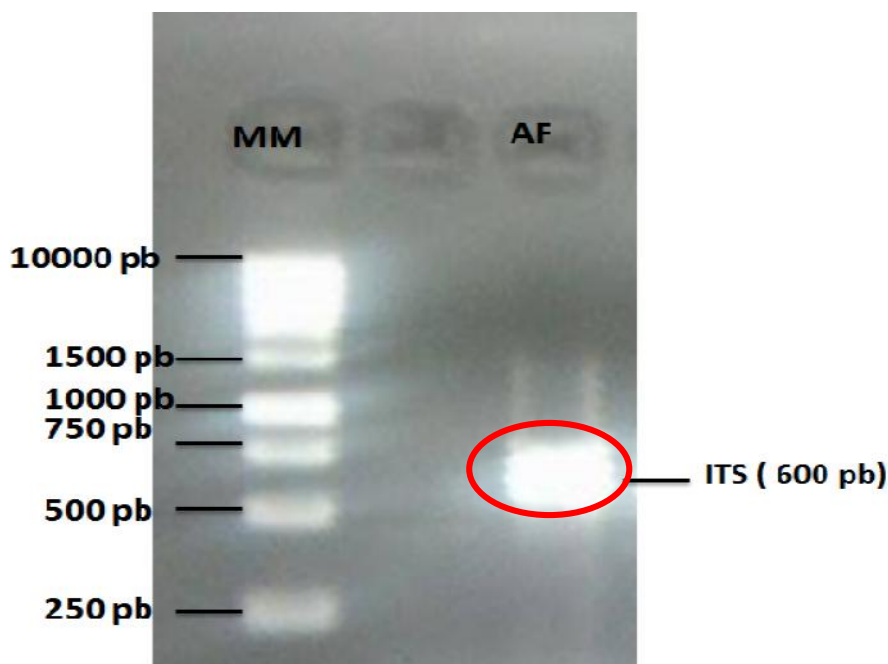


Figure10. Migration des bandes d'ADN d'*ITS* de l'isolat **I₁** sur gel d'agarose 600pdb. **MM** Marqueurs moléculaires.

Ce résultat corrobore ceux développés par Kumeda et Asao, (1996) qui ont montré à travers l'application de la PCR-SSCP et PCR-RFLP, que la bande d'ADN de l'*A. flavus* a un fragment de 600 pdb correspondant à l'amplification de la région ITS1 / 5.8S / ITS2 avec l'amorce ITS1-ITS4. En outre, une autre étude utilise les régions *ITS1* et *ITS2*, a trouvé que les amplicons (fragments d'ADN) de différentes espèces d'*Aspergillus* ont une taille variée de 565 à 613 pdb. (Travis *et al.*, 2000).

4.2.3.3. Séquençage

Après le séquençage du gène *ITS* rDNA d'*Aspergillus* sp les séquences obtenues (figure 10) ont été corrigées par le programme Chromas Pro 17, et comparées à celles précédemment publiées dans la banque GenBank. Cette étude a montré que les séquences sont similaires à celles d'*Aspergillus flavus*, avec un pourcentage de similitude de 99% et ce qui a permis son enregistrement sous le numéro d'accèsion (**gi | 146746162 | EF409803.1**) au niveau de la même banque.

```
AAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAA
GCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCC
CCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAA
TGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCA
AAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTGCTGC
GTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTG
CGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGC
GGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCG
AAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCT
ACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGTCACCCTGACGGGAAATACCGAG
```

Figure11. Séquences finales du gène *ITS* après avoir été corrigé à l'aide du programme «Chromas Pro 17 ».

La région conservée *ITS* est une approche très utile pour la vérification morphologique et phénotypique et phylogénétique depuis près de 20 ans, offre des avantages distincts car il

affiche habituellement la variation de séquence entre les espèces ainsi que les variations mineures des souches de la même espèce (Imge Oktay, 2011).

Henry *et al.*, (2000), Geiser *et al.*, (2007), Sanchez-Hervas *et al.*, (2008) et Karthikeyan *et al.*, (2009) ont toutes noté la capacité des techniques moléculaires pour différencier les *Aspergillus*. Cette approche moléculaire est également utilisée pour identifier les espèces d'*Aspergillus* tel que *A. flavus*, *A. fumigatus* qui sont la cause d'Aspergillose invasive, par amplification des régions *ITS1* et *ITS2* conservées de 18S et 28S rDNA (Henry *et al.*, 2000). D'après Manonmani *et al.*, (2005) et Imge Oktay, (2011) les techniques moléculaires par l'utilisation de plusieurs régions ont également été largement appliquées pour différencier les souches aflatoxigéniques et non aflatoxigéniques des espèces d'*Aspergillus*.

Chapitre II

Matériel végétal

1. Introduction

Jadis, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Et depuis, l'homme s'intéresse aux plantes et l'histoire des substances naturelles s'identifiant en partie à celle de la pharmacie, à savoir la pharmacognosie qui étudie les remèdes naturels et les substances biologiquement active

Actuellement, dans le monde près de 25% des prescriptions sont à base de plantes, et selon les estimations de l'OMS en 2002, plus de 80 % de la population en Afrique, utilisent encore les plantes médicinales pour répondre à leurs besoins de soins et de santé. L'Algérie ne fait pas exception, et l'utilisation de ces plantes pour le traitement de différentes maladies s'est développée de manière spectaculaire.

Face aux contraintes thérapeutiques des médicaments de synthèse chimique liées au coût élevé, leurs toxicités, et l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural qui limite une véritable prise en charge des problèmes de santé, les populations font recours à la médecine traditionnelle.

De nombreux extraits d'origine végétale sont une source riche de composés biologiquement actifs. Ces composés sont des métabolites secondaires tel que les polyphénols, possédant des activités biologiques diverses, notamment les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, et anticancéreuses (Surhet *al*, 2001).

Lycium halimifolium Mill est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. La composition chimique et les propriétés biologiques de ses fruits sont largement développées, alors que, ses feuilles demeurent peu étudiées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la stratégie de cette partie, dont l'objectif essentiel est à l'étude phytochimique des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, afin de valoriser, *in vitro* et *in vivo* les ressources de cette espèce et de mettre en évidence les éléments non développés auparavant.

2. Synthèse Bibliographique

2.1. Le *Lycium*

2.1.1. Habitat naturel

Le *Lycium* est répandu dans les régions tempérées à subtropicales, de l'Europe méridionale à l'Asie, d'Amérique du nord et du sud, d'Afrique, d'Australie et d'Eurasie (Fukuda *et al.*, 2001) (Figure 12). Selon une analyse phylogénétique moléculaire (analyse de séquence d'ADN) de l'ADN de chloroplastes d'espèces du genre *Lycium* en 2001, on distingue deux grands clades deux grands clades sont distingués : l'un comprenant les espèces d'Eurasie, Afrique méridionale et Australie, et l'autre celles d'Amérique du Sud, Amérique du Nord et Pacifique (Fukuda *et al.*, 2001 ; Amagase et Farnsworth, 2011 ; Pungier, 2012).

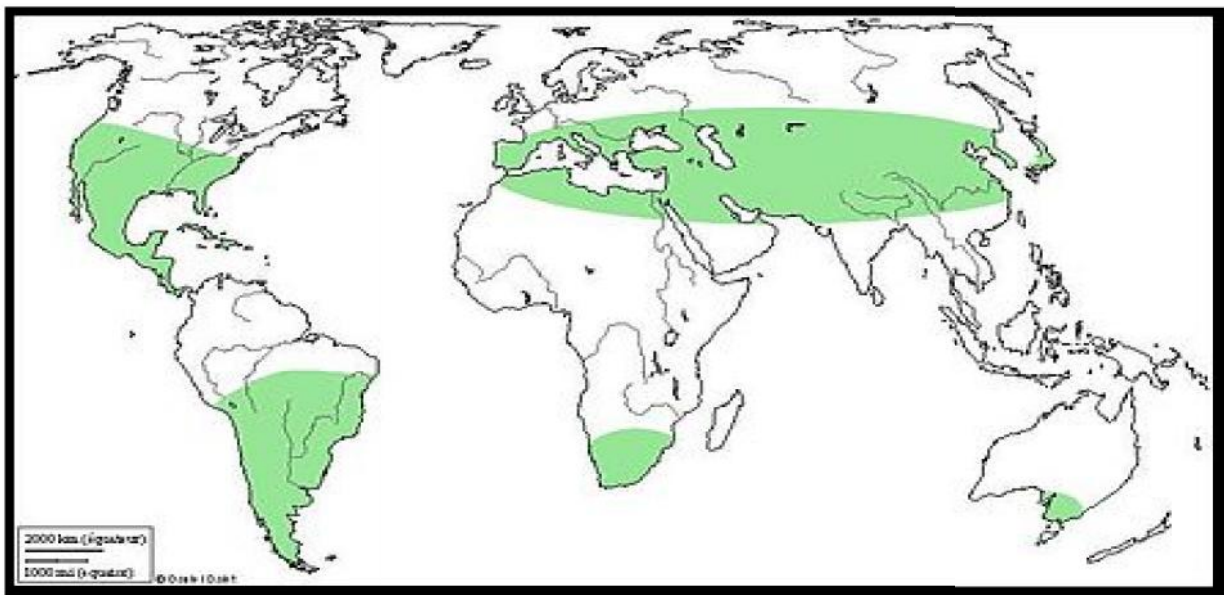


Figure 12. Distribution du genre *Lycium* dans le monde (Fukuda *et al.*, 2001).

2.1.2. Caractéristique de la famille de solanacées

Riche de 85 genres répartis en 3000 espèces, cette famille est surtout présente dans les régions tropicales d'Amérique du sud et centrale, ainsi qu'en Afrique (Heywood *et al.*, 2002 ; Spichiger *et al.*, 2004). En Europe, il existe une quinzaine d'espèces sauvages, dont la moitié est méditerranéenne. Une grande partie assez importante de ces espèces se développe dans des lieux riches en matière organique en décomposition. Cette famille regroupe de nombreuses

espèces toxiques en raison a cause de leur teneur en alcaloïdes (solanine, scopolamine, atropine, etc.). Ce Sont en général de grandes plantes herbacées ou arbustives, se développent souvent d'une manière indéterminée, ne différenciant pas les premières feuilles des suivantes, les fleurs se répartissent sont dispatchées sur toute la hauteur de la plante et par cette attitude semble ne jamais terminer leur cycle. Les fruits sont des baies charnues, possédant comme les fleurs une grande variété de couleurs et de formes. Les graines contenues dedans sont en forme de rein ou de lentille. Elles renferment au milieu d'un albumen charnu, une plantule courbée ou en spirale (Delaveau, 2003 ;Dupont et guignard, 2012). Les légumes de cette famille, tomates, aubergines, sont essentiellement autogames, le poivron peut présenter une part d'allogamie qui impose son isolement. La pollinisation est entomophile, c'est l'action mécanique de l'insecte (bourdons, abeilles) qui provoque la fécondation (Botineau, 2010).

2.1.3. Caractéristiques du genre *Lycium*

Le genre *Lycium* regroupe une centaine d'espèces herbacées et sarmenteuses, arbuste épineux et arbrisseaux. Leurs feuilles sont simples, alternes ou groupées, et courtement pétiolées. Le calice, plus petit que la corolle, comporte un tube relativement étroit qui se termine par cinq lobes étalés, sous forme en de cloche. Les fleurs sont petites, pourpres, violacées ou blanchâtres, isolées ou axillaires. Les cinq étamines sont fondues longitudinalement, de longueurs inégales, à anthères non conniventes. Le fruit est une baie globuleuse et charnue de couleur rouge à rouge-orangé, voir pourpre à maturité. Toutes les espèces du genre *Lycium* peuvent être retrouvées dans les haies mais également comme plantes ornementales (Delaveau, 2003 ; Botineau, 2010 ; Maitre, 2011).

2.1.4. Description botanique de *Lycium*

Un arbrisseau touffu, plus ou moins épineux mesurant de 1 à 5 mètres de longueur. Ses rameaux sont flexueux, ténus et assez faibles, retombant ou pendant et peuvent être un peu anguleux dans leur longueur. Ses feuilles, peu épaisses, au limbe ovale-allongé et à nervures secondaires apparentes, sont courtement pétiolées. Elles sont alternes, simples et entières, à marge lisse. Cette plante possède des tiges souterraines (rhizomes) cylindriques et peu ramifiées, poussant près de la surface puis se développant en profondeur (Bonnier *et al.*, 1990). Des racines adventives partent de cette tige et poussent en direction de la lumière, ses fleurs violet-clair sont visibles de mars à octobre, voire même en hivers. Le calice est très

irrégulier et forme deux lèvres dentées ou non sur chaque division. La corolle est en entonnoir, à 5 lobes récurvés voir renversées. Elle est 4 à 5 fois plus longue que le calice, avec un tube de même longueur que ses lobes étalés. Les pédoncules floraux sont, en général, plus longs que les fleurs. Et les étamines, irrégulières, sont nettement saillantes (Boullard, 2001; Maitre, 2011).

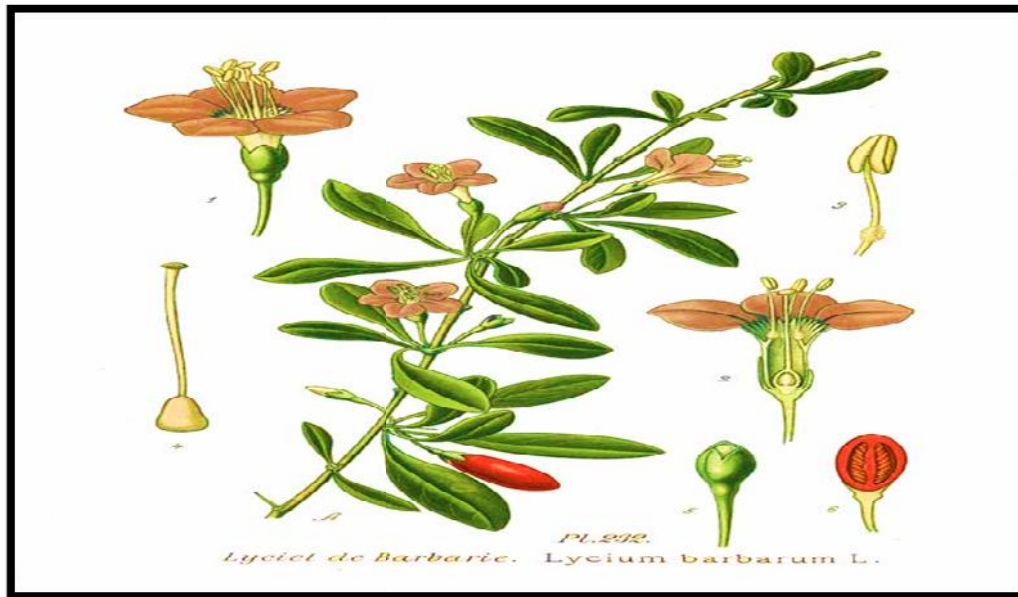


Figure 13. Planche botanique de *Lycium halimifolium* Mill [4]

2.1.5. Nomenclature et systématique de *Lycium halimifolium* Mill

2.1.5.1. Nomenclature

Le mot grec lykion, en latin *Lycium* a donné le nom français lyciet signifiant originaire de Lycie (Sharamon et Baginski, 2009). Le nom « goji » a été donné par le médecin et botaniste tibétain Dobosbradley en 1974 (Maitre, 2011). Le nom binominal latin *Lycium barbarum* L. a été attribué par l'illustre botaniste suédois, Carl von Linné en 1753 (Amagase et Farnsworth, 2011). Le *Lycium barbarum* L., encore appelé lyciet de Barbarie ou lyciet commun, possède de nombreux synonymes latins : *Lycium halimifolium* Mill, *Lycium turbinatum* Loisel, *Lycium vulgare* Dunal, *Lycium trewianum* Roem. et Schult. (Li, 2009).

2.1.5.2. Systématique

Selon la classification phylogénétique APG II (Boitineau, 2010), le *Lycium* appartient aux angiospermes Eudicotylédones évoluées, encore appelées Astérides. Il appartient à l'ordre des Solanales, à la famille des solanaceae et au genre *Lycium*.

Règne	: <i>Plantae</i>
Sous-Règne	: <i>Tracheobionta</i>
Super-division	: <i>Spermatophyta</i>
Division	: <i>Magnoliophyta</i>
Classe	: <i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	: <i>Asteridae</i>
Ordre	: <i>Solanales</i>
Famille	: <i>Solanaceae</i>
Genre	: <i>Lycium</i>
Espèce	: <i>Lycium halimifolium</i> Mill

2.2. Composition chimique de la plante

2.2.1. Principaux constituants de la baie de goji

2.2.1.1. Composés phénoliques

Parmi les flavonoïdes identifiés dans le biais de *Lycium halimifolium* M, la sous-classe des flavonols sous forme d'hétérosides (quercétine, rutine et kaempférol) et des flavonoïdes non-glycosylés (les flavonols ou catéchines (tanins condensés), on peut rencontrer également de la myricétine (Pungier, 2012). Cependant, Les acides phénoliques sont représentés essentiellement par l'acide caféoylquinique et ses isomères (Wanget *al.*, 2010). Dans une autre étude, l'analyse d'un échantillon de fruit de *Lycium halimifolium* M par un système de chromatographie liquide à haute performance à détecteur UV à barrettes de diodes couplés à un spectre de masse à trappes d'ion (CLHP-DAD-ESI-SM), a permis la détermination

simultanée d'acides phénoliques et des flavonoïdes. Parmi 52 polyphénols testés, 15 acides phénoliques et flavonoïdes ont été identifiés positivement dans le *Lycium halimifolium* M, à savoir : quercétine-rhamno-di-hexoside, quercétine-3-O-rutinoside (rutine), acide dicaféoylquinique et ses isomères, Acide chlorogénique, Quercétine-di-rhamno-(hexoside), kaempférol-3-O-rutinoside, isorhamnétine-3-O-rutinoside, acide p-coumarique, acide caféique, acide vanillique, acide férulique, acidehydroxycinnamique et dérivés (Inbarajet *al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010).

L'étude de Boullila *et al.*, (2015) a identifié par HPLC-PDA-SM, que l'acide caféoylquinique et l'acide chlorogénique sont les composants majoritaire des fruits de *Lycium*.

2.2.1.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des métabolites majoritaires dans le *Lycium halimifolium* M., présents sous 11 formes libres et 7 estérifiées. Parmi ces molécules, la B-carotène, notamment, est responsable de la couleur rouge-orangé du fruit. Le dipalmitate de zéaxanthine est majoritairement présent dans ce fruit (30 à 50% des caroténoïdes totaux), suivi de la B-cryptoxanthine, du monopalmitate de zéaxanthine et de ses 2 isomère, et de la forme trans-du B-carotène. La zéaxanthine est un isomère de la lutéine, dérivée du B-carotène (Sharamonet Baginski, 2009, Amagase et Farnsworth, 2011).

2.2.1.3. Autres constituants

les baies de *Lycium* sont riche en sels minéraux et en oligoéléments à savoir : K, Na, P, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Mo, Co (Martinez *et al.*, 2013). Une autre étude a montré que les vitamines du groupe B (B1 B2 et B3) sont présentes en quantité notable avec la vitamine A dans le Goji (Sharamon et Baginski, 2010). Les baies de Goji contiennent également 6-16% de protéines, 40-60% glucides dont les polysaccharides (LBP) tel que les glycoprotéines ou protéoglycane sont les composés les plus importants de Goji (31%), responsable entre autre de ses propriétés antioxydantes, et des lipides 0.45-1.40% (Wanget *al.*, 2009; Potterat, 2010 ; Amagase et Farnsworth, 2011 ; Pungier, 2012).

2.2.2. La composition des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill

Les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill (*Lycium Barbarum* L.) sont considérées comme un thé fonctionnel ou comme suppléments diététiques (Mocanet *al.*, 2017). Cependant, les feuilles de *L. barbarum*, appelées (vitalité et la vigueur de la nature) dans la médecine traditionnelle chinoise, ont été rarement étudiés, malgré leurs utilisations dans l'atténuation des carences minérales, combattre la détresse, éteindre la soif, dissiper le vent et améliorer la vue (Chen *et al.*, 2015). En outre, l'information sur la composition chimique et la bioactivité des feuilles de *L. barbarum* n'est pas exhaustive et assez limitée. En effet, récemment, les feuilles de Goji ont été décrites comme une source durable d'antioxydants et de composés antibactériens (Mocanet *al.*, 2014 ;Gonget *al.*, 2016).

Selon Mocan *et al.*,(2014),les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill contiennent en quantité importante de la rutine et acide chlorogénique. Cependant, il a identifié également la présence de l'acide caféique, a. gentisique, a. coumarique, a.férulique, isoquercitrine, quercetine et la quercitrine.

Par ailleurs, des études ont montré que les feuilles de *Lycium* renferment divers composés tels que des flavonoïdes (quercétine, kaempférol, rutine, nicotiflorine, l'acide chlorogénique et isoquercitrine) mais aussi d'autres molécules comme l'acide vanillique, l'acide salicylique et l'acide nicotinique (Maitre,2011 ; Boulila *et al.*, 2015).

Cependant, la dernière étude de Mocanet *al.*, en janvier 2017, a montré la richesse des feuilles de *Lycium halimifolium* par les composés phénoliques, il a également identifié la présence des acides phénoliques comme : l'acide chlorogénique (majoritaire), acide 5-O-Feruloylquinique, et des flavonoïdes glycosidés tel que : Quercetin-3-O-Glu-7-O-Rha, Kaempferol-3-O-Rhu, Kaempferol-3-O-Glc-7-O-Soph.

2.2.3. Principaux constituants des écorces

Les écorces de *Lycium* sont caractérisés par une richesse en composés phytochimiques tels que des peptides cycliques, un glycoside dérivé nitrogénés, des alcaloïdes, des composés phénoliques, de l'apigénine et des terpénoïdes (Maitre, 2011).

2.2.4. Principaux constituants des fleurs

Les fleurs de *Lycium* contiennent de la diosgénine, du B-sitostérol, et du lanostérol (Potterat *et al.*, 2010).

2.3. Propriétés pharmacologiques de *Lycium halimifolium* Mill

2.3.1. Renforcement du système immunitaire

Les glycopeptides de la plante de *Lycium halimifolium* Mill agissent comme un stimulant du système immunitaire (Potterat et Matthiasal, 2008). Ils augmentent la réponse immunitaire, ils favorisent notamment la fabrication et l'activation des lymphocytes T et des cellules Natural killer ainsi que la sécrétion, la prolifération et la différenciation des cytokines (hormones de régulation immunitaire) qui augmentent la réponse immunitaire qui aide à lutter contre les maladies infectieuses (Chenet *al.*, 2008). Les polysaccharides renforcent l'immunité également par leurs effets antioxydants. Les propriétés d'immunomodulation présentées par le Goji nous mènent directement à un autre bienfait de ce fruit : son action contre le cancer (Ganet *al.*, 2004 ; Giordano, 2009).

2.3.2. Effet régulateur du diabète de type 2, hypolipémiant et antihypertenseur

Le diabète de type 2 toujours provoque une hyperglycémie et une hyperlipémie et il entraîne également un stress oxydatif par la glycation entre le sucre sanguin en excès et les protéines tissulaires, qui permet la formation de radicaux et la peroxydation lipidique. Un traitement de dix jours avec divers extraits de baies de *Lycium halimifolium* Mill administré à des lapins présentant un diabète avec hyperlipémie réduit de manière significative leur glycémie, leur taux de cholestérol total et celui de triglycérides (Luo *et al.*, 2004). Ces effets hypolipémiants et hypoglycémiant ont aussi été étudiés notamment par Zhao, (2005), qui a trouvé une résistance spécifique pour l'insuline et une diminution de la concentration plasmatique de triglycérides et de cholestérol et de la glycémie postprandiale, et une perte de poids, chez des souris avec un diabète non insulino-dépendant traitées aux LBP.

2.3.3. Effet neuroprotecteur dans les maladies neurodégénératives

Des études montrent l'efficacité des polysaccharides des extraits du *Lycium* qui agissent comme neuroprotecteurs contre l'apoptose et contre la toxicité du peptide bêta-amyloïde (-a) connu comme néfaste pour le système nerveux par la formation de plaques à l'origine de la maladie d'Alzheimer (Giordano, 2009).

2.3.4. Effet protecteur de la vision, contre le glaucome, la dégénérescence maculaire et la cataracte

Les glycopeptides du *Lycium* jouent un rôle protecteur des cellules ganglionnaires de la rétine. Donc permet de diminuer la perte des fibres nerveuses en cas d'hypertension oculaire, puisqu'elle protégerait les fibres saines avoisinantes par la neutralisation des composés neurotoxiques (glutamate, oxyde nitrique) excrétés lors de la destruction de ces fibres. Certains caroténoïdes qui présentent en quantité importante dans la baie de Goji, comme la lutéine et la zéaxanthine constituent une source directe de nutriments et d'antioxydants pour les yeux et les protègent (Giordano, 2009 ;Chen *et al.*, 2015).

3. Matérielset Méthodes

Cette partie s'est déroulée en deux temps l'une sur terrain et l'autre au laboratoire. Concernant la phase de terrain, elle consiste à la collecte des feuilles, avec une enquête ethnobotanique de l'espèce sélectionnée. Quant aux travaux de laboratoire, ils ont été conduits au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et l'Activité Microbienne (**LaMyBAM**) et le Centre d'Ingénierie des Protéines (**CIP**) à l'université de Liège en Belgique.

3.1. Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique est un travail qui consiste à aller à la rencontre des praticiens traditionnels pour s'enquérir de leur méthode de traitement des maladies. Cette enquête est indispensable dans la mesure où elle nous permet de nous orienter afin de cibler certains tests biologiques. L'outil de travail est élaboré en une série de questionnaires (**voir annexe1**)

3.2. Lieu et période de cueillette de la plante

L'espèce sélectionnée a été récoltée dans leur habitat naturel ; les montagnes de « Djebel Chettaba » à Ain Smara, Constantine, situé à 1266 mètres d'altitude avec 36°19'41" N et 6°27'4"E. L'identification botanique a été faite par Pr. Khalfalah N, Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, Université des frères Mentouri, Constantine. La collecte du matériel végétal a eu lieu en journée et en plein printemps (période de floraison) entre le 02 Mars et le 30 Avril 2013.

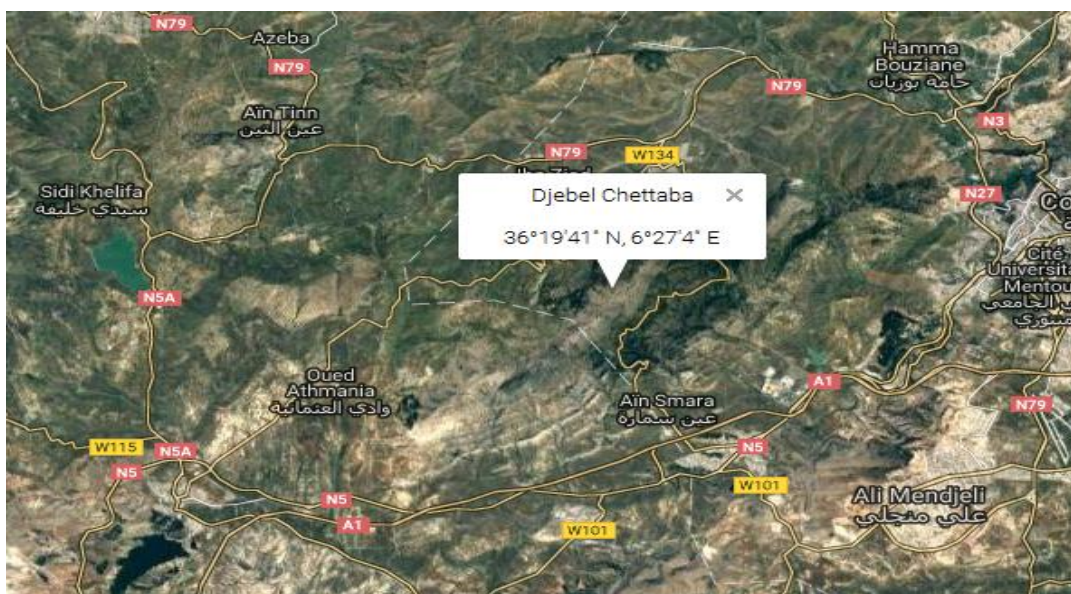


Figure 14. Localisation géographique de djebel Chettaba

3.3. Préparation de l'échantillon

Une fois, la récolte du matériel végétal réalisé, la partie aérienne est, ensuite, séchée à l'ombre à température ambiante, ce séchage est effectué dans un endroit protégé afin d'éviter des interférences causées par la poussière, les insectes ravageurs ou les rongeurs. Les feuilles sont étalées en couches non épaisses pour optimiser le séchage afin d'éviter les moisissures, puis, elles sont écrasées dans un mortier avant de passer au travers d'un tamis et enfin, finement pulvérisées au moulin. La poudre obtenue est stockée dans des petits sacs en papier, étiquetés puis conservés à l'ombre.

3.4. Le criblage phytochimique

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Toutefois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative. Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit la formation de complexe colorés en utilisant des réactions de coloration.

3.4.1. Tests des métabolites secondaires

3.4.1.1. Test des alcaloïdes

Selon Bruneton, (1999), une quantité de 5 g de la poudre végétale est ajoutée à quelques gouttes d'eau distillées avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 0.5N. L'extrait obtenu après filtration de la solution est reparti sur trois tubes correspondant respectivement à Wagner (iodo-iodure de potassium) qui donne un précipité brun, Valser Mayer (tétraiodomercurate de potassium) qui donne un précipité blanc jaunâtre et Dragendorff (d'iodure de mercure de potassium) qui donne un précipité orangé, et l'apparition de ces couleurs révèle la présence des alcaloïdes.

3.4.1.2. Test des saponosides

Les saponosides sont des substances très fréquentes chez les végétaux, ils sont caractérisés par leur pouvoir moussant en solution aqueuse qui donne l'indice de mousse. Un décocté à 1% est

préparé avec 1g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante et maintenir une ébullition légère pendant 15 minutes puis la suspension est filtrée. On introduit dans 10 tubes à essai successivement 1 à 10 ml de filtrat en complétant le contenu de chaque tube à 10 ml avec de l'eau. On agite le contenu de chaque tube pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde. La hauteur de mousse est mesurée 15 minutes après. L'indice de mousse est calculé à partir du numéro de tube (N) dans lequel la hauteur de mousse est de 1cm. $I_m = 1000/N$ (Diallo D *et al.*, 2004).

3.4.1.3. Test des stérols et triterpènes

La présence des stérols et triterpènes est mis en évidence à l'aide de H₂SO₄ concentré. Un extrait est tout d'abord réalisé à partir d'une macération pendant 24 heures de 1g de poudre de la plante dans 20 ml d'éther. L'extrait obtenu servira en plus des stérols à la caractérisation des caroténoïdes et des coumarines. Les stérols et triterpènes sont mis en évidence par ajout de 1 ml de CHCl₃ au résidu de 10 ml du macéré évaporé. La solution obtenue est partagée dans deux tubes à essais, puis 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré sont ajoutés au fond de l'un des tubes, l'autre servira de témoin. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, révèle leur présence (Bruneton, 2009).

3.4.1.4. Test des dérivés anthracéniques

On retrouve les dérivés anthracéniques dans les plantes, sous forme de génies (ou aglycones) libres ou sous forme combinée d'hétérosides anthracéniques. La présence des dérivés anthracéniques est mise en évidence à l'aide de la solution NH₄OH diluée à 50%. Un extrait chloroformique est préparé à partir de 1g de poudre d'échantillon dans 10 ml de CHCl₃, suivi d'un chauffage pendant 3 minutes au bain-marie. La solution est filtrée à chaud. Le résidu de la poudre épuisée par CHCl₃ servira à mettre en évidence les formes hétérosidiques (O-hétérosides). Les anthracéniques libres, sont mis en évidence en ajoutant 1ml de solution NH₄OH diluée à 1ml d'extrait chloroformique, suivi d'une agitation. L'apparition d'une coloration plus ou moins rouge indique leur présence (Badiaga, 2011).

Les O-hétérosides sont caractérisés par ajout au résidu de la poudre épuisée par CHCl₃ précédemment, 10 ml d'eau plus 1ml de HCl concentré, chauffer l'ensemble pendant 15 minutes au bain-marie, puis refroidir sous courant d'eau froide et filtrer. A5 ml du filtrat sont

ajoutés 5 ml de CHCl_3 , après agitation soutirer la phase organique. L'apparition d'une coloration rouge ou moins intense indique la présence des O-hétérosides.

Les C-hétérosides sont caractérisés par ajout de 10ml d'eau et 1ml de solution FeCl_3 à 100% à la phase aqueuse obtenue précédemment avec les O-hétérosides, le mélange est chauffé 30 minutes au bain-marie et refroidi sous courant d'eau. La phase organique est séparée après agitation avec 5 ml de CHCl_3 et 1ml de NH_4OH diluée et ajouté. L'apparition de la coloration rouge plus ou moins intense la présence des C-hétérosides (Badiaga, 2011).

3.4.1.5. Test des tanins

La présence de tanins galliques et catéchiques a été mise en évidence à l'aide de perchlore ferrique. Pour ce faire, un infusé à 5% est préparé en mettant 5g de poudre de l'échantillon dans 100 ml d'eau bouillante. Après 15 minutes, la suspension est filtrée et rincée pour obtenir 100 ml d'infusé à 5%. Cet infusé servira également à caractériser les flavonoïdes. Les tanins galliques, hydrolysables, sont mis en évidence par ajout de 15 ml de réactif de Stiasny à 30 ml de l'infusé à 5%, après 15 minutes de chauffage au bain-marie à 90°C , le mélange est filtré et saturé par 5 g d'acétate de sodium, ensuite il est additionné de 1ml de solution de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une teinte bleue indique la présence de tanins galliques. Les tanins catchiques, non hydrolysables, sont caractérisés par addition de 1 ml de HCl concentré à 5 ml d'infusé préalablement préparé, le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence de tanins catéchiques un précipité rouge insoluble dans l'alcool iso-amylique, se forme. Les tanins catéchiques sont aussi mis en évidence après l'addition du réactif de Stiany par la formation de précipité (Bruneton, 2009).

3.4.1.6. Test des coumarines

Pour détecter les coumarines, 0,5 g de la poudre sont mis dans un tube à essai contenant du méthanol, puis les tube à essai sont fermé avec du papier imbibé avec du NaOH (1N). Les tubes sont, ensuite, placés dans un bain pendant quelques minutes, puis observés sous lampe UV à 365 nm. L'apparition d'une fluorescence jaune indique leur présence (Trease et Evans, 1989).

3.4.1.7. Test de phlobatannins

En dissolvant 0,5 g de poudre dans 10 ml de méthanol (50%) après filtration, on fait bouillir le filtrat avec HCl à 1%. L'apparition d'un précipité rouge indique leur présence (Sofowora, 1993).

3.4.1.8. Test des résines

Le test de précipitation implique de mettre 0,2 g de la poudre dans 15 ml d'éthanol à 96%, l'extrait d'éthanol après filtration est traité avec 20 ml d'eau distillée. L'apparition d'un précipité blanc indique leur présence (Evans, 2002).

3.4.1.9. Test de flavonoïdes

La recherche des flavonoïdes est réalisée par une macération de 10 g de la poudre dans 150 ml d'acide chlorhydrique (HCl 1%) pendant 24 h. Après filtration, une solution alcaline de NH₄OH est ajoutée au 10 ml de filtrat. L'apparition de couleur jaune claire dans la partie supérieure de tube indique la présence des flavonoïdes (Harborne, 1998).

3.4.1.10. Composés volatils

Les composés volatils ont été identifiés par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un extracteur de type Clevenger (Alitonouet *al.*, 2012).

3.4.1.11. Les composés réducteurs

Macérez 5g de la poudre dans le méthanol, après filtration, on ajoute 0.5 - 1 ml de la solution de Fehling (A+B). L'apparition d'une couleur rouge brique indique leur présence.

3.4.2. Tests des métabolites primaires

3.4.2.1. Les carbohydrates

Après macération de 100 mg de la poudre dans 5 ml d'eau distillé, l'extrait aqueux est testé par deux tests différents l'un est le test Molish réalisé en ajoutant 2 gouttes de Molisch (10%

d' -naphtol dans l'éthanol) avec 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré versé sur le côté du tube à essai. Ainsi, l'apparition d'un anneau violet indique la présence des carbohydrates.

L'autre est le test de Fehling, réalisé par un chauffage de 1ml de l'extrait avec solution de Fehling (A+B). L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des carbohydrates.

3.4.2.2. Les protéines et les acides aminés

La révélation des protéines par la réaction de Biuret mettant en évidence les liaisons peptidiques. La méthode consiste à mettre en milieu basique des ions cuivre(II) en présence de protéines. Un complexe coloré mauve ou violet se forme à 540 nm.

La révélation des acides aminés a été réalisée par le test de Ninhydrine, et une couleur violette apparait.

3.5. Extraction des composés phénoliques totaux

Cette étape qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétal, est primordiale car elle déterminera la quantité et la nature des substances extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes. L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode de Markham, (1982), avec modification inspirée selon la méthode de Bruneton, (1993), Bekkara *et al.*, (1998).

3.5.1. Extraction solide-liquide (ESL)

L'extraction des polyphénols est effectuée par macération à partir de la matière sèche finement broyée dans le méthanol 80% (v/v), le volume de solvant doit d'être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums solide-liquide les plus souvent trouvés dans la littérature sont 1/10 ou 1/50 (mg/ml) (Michel, 2011), dans la présente étude que nous avons choisie 1/10. Après macération de 24 heures avec agitation, le macérât est filtré sur Büchner sous pression réduite puis soumis à une évaporation à basse pression à 50°C par un Rota Vapor (Heidolph.4000 efficient). La phase aqueuse (le filtrat) ainsi obtenue est conservée 48 heures à 40°C pour accélérer la diffusion des molécules dans les solvants puis filtrée.

3.5.2. Fractionnement de l'extrait hydrométhanolique par Extraction liquide-liquide (ELL)

Dans le but de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques, un fractionnement liquide-liquide est réalisé entre deux phases non miscibles. l'extrait hydrométhanolique est débarrassé d'abord des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole (v/v) pour donner une phase aqueuse. Afin de séparer les flavonoïdes en fractions aglycones, monoglycosides et di et triglycosides, la phase aqueuse est mélangée avec chloroforme (v/v) pour obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. La phase aqueuse restante subit à son tour trois extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique certains flavonoïdes aglycones mais surtout les monoglycosides. La phase aqueuse restante est mélangée avec le n-butanol pour récupérer notamment les flavonoïdes di et triglycosides. La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires (**Figure 13**). Les deux fractions récoltées acétate d'éthyle (**ACT**) et butanolique (**BUT**) qui font l'objet de cette études, sont concentrées par évaporation à basse pression à 45°C puis lyophilisées pendant 24 heures. La lyophilisation permet d'obtenir un produit facilement soluble dans l'eau et qui, après addition d'eau, présente les mêmes caractéristiques que le produit d'origine. Chaque lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction, exprimé en gramme de lyophilisat par 100 g de matière sèche. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R (\%) = M \times 100/M'}$$

R: Rendement de chaque phase

M: masse de l'extrait de chaque phase

M': masse de la matière sèche de la plante

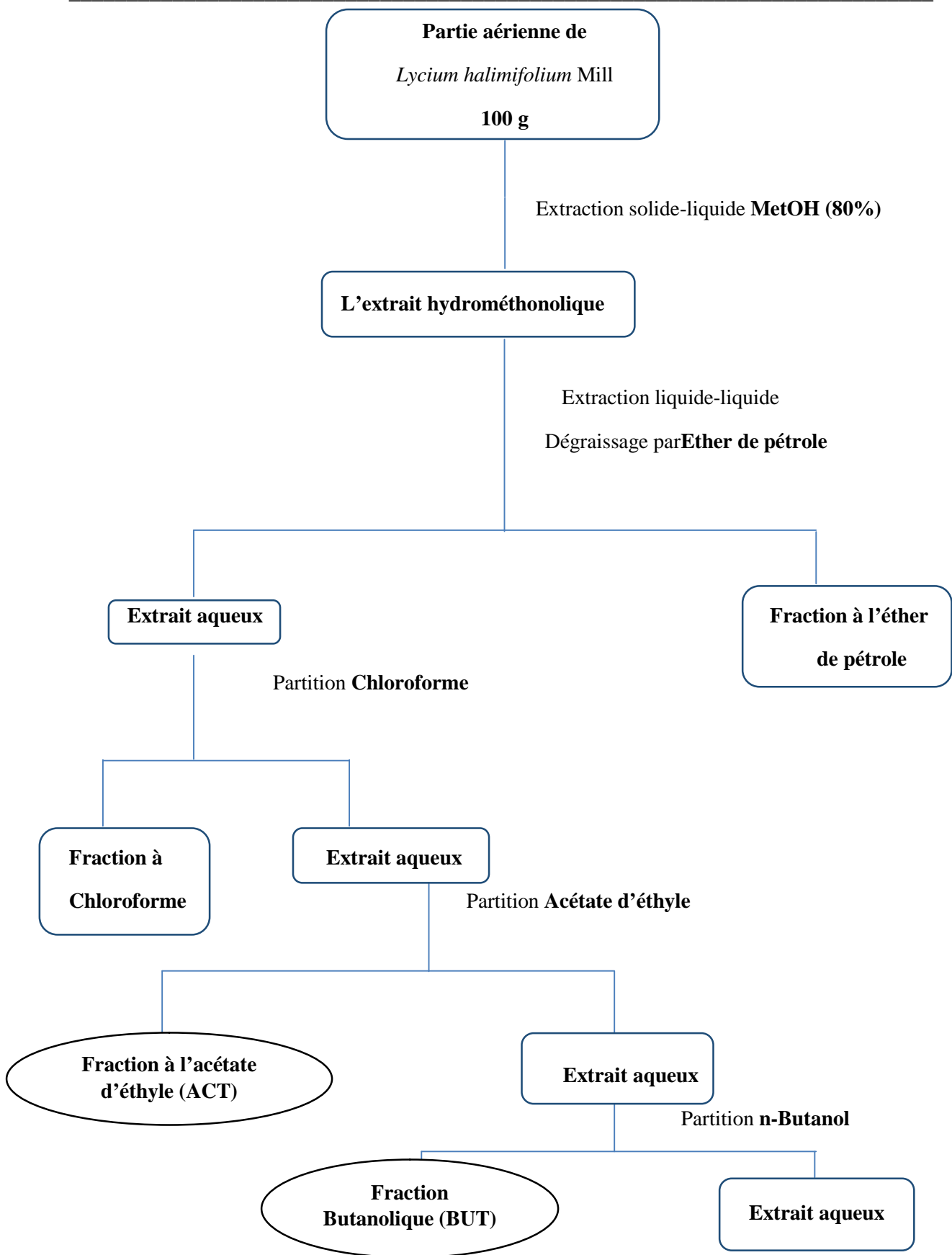


Figure 15. Schéma résumant les étapes de l'extraction des parties aériennes de *Lycium halimifolium* Mill par les solvants organiques.

3.6. Analyses quantitative des composés phénoliques par spectrophotométrie (Visible)

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par le réactif de Folin-Ciocalteu, et les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium, tandis que le dosage des tannins condensés a été réalisé par l'utilisation de vanilline. La raison principale pour le choix de ces composés réside dans le fait que la majorité des propriétés biologiques des plantes leurs sont attribuées.

3.6.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par Wong *et al.*, (2006).

3.6.1.1. Principe

La teneur phénolique totale (PPT) est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstiquephosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005). Brièvement, 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation, 800µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g/l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre (SHIMADZU.UV1280) à 765 nm.

3.6.1.2. Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg}$).

3.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

Pour le dosage des flavonoïdes totaux, la méthode utilisée est celle développée par Zhishen *et al.*, (1999) puis par Chen et Chen, (2011) avec quelques modifications de (Ghnimi, 2015).

3.6.2.1. Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et de soude entraînant ainsi la formation d'un complexe détecté à 510 nm. La méthode consiste à placer dans des tubes à essais et d'une manière successive, 250 µl de l'extrait étudié et 1 ml d'eau distillée. Au n temps initial (0 minute) on ajoute 75 µl d'une solution de NaNO₂ (5%), après 5 minutes 75 µl de AlCl₃ (10%) sont ajoutés. 6 minutes après 500 µl de NaOH (1N) sont ajoutés ainsi que 2, 5 ml d'eau distillée. L'absorbance de chaque mélange obtenu est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm.

3.6.2.2. Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

3.6.3. Dosage des tannins condensés (TC)

Pour doser les tannins condensés, la méthode de vanilline a été utilisée (Sun *et al.*, 1998 ; Schofield *et al.*, 2001).

3.6.3.1. Principe

Au cours de cette réaction, la vanilline va réagir avec les tannins condensés pour donner des complexes colorés qui absorbent à 500 nm. Donc, 5 g de matière sèche de chaque échantillon a été lixivié dans le n-hexane, le résidu obtenu est séché à température ambiante. Ensuite, un mélange formé de 0,5 g de résidu avec 15 ml d'une solution de méthanol-HCl (1 %) est préparé. Le mélange obtenu est placé dans un tube à essai, vortexé puis placé dans un bain marie à 35°C pendant 20 minutes. Après incubation le tube est centrifugé à 1532 x g puis et le surnageant est récupéré. 1 ml du surnageant est mélangé avec 3 ml d'une solution de la vanilline. Cette dernière est formée de 4 g de vanilline et 100 ml de méthanol-HCl (8%).

Toutes les solutions ainsi que les blancs sont préparés dans les mêmes conditions. Les tubes obtenus sont de nouveau incubés à 35°C pendant 20 minutes. Après cette deuxième incubation l'absorbance de chaque solution obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 500 nm.

3.6.3.2. Expression des résultats

La courbe d'étalonnage établie à partir des solutions de différentes concentrations de catéchine permet d'exprimer la concentration des tannins condensés en µg équivalent de catéchine par milligramme de matière sèche (EC/g MS).

3.7. Identification des composés phénoliques par HPLC-PDA

Cette analyse a été effectuée au centre d'ingénierie des protéines (CIP), université de Liège-Belgique.

HPLC demeure la technique la plus utilisée, car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, ses possibilités de coupler avec d'autres techniques chromatographiques et système de détection et autres. Elle fait intervenir une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. Notre choix s'est basé sur les fractions **ACT** et **BUT** qui ont montré une bonne activité biologique.

3.7.1. Appareil HPLC-PDA

Le système de HPLC consistait Waters e2695 séparations Modules, équipé d'un détecteur à réseau de photodiodes (PDA), une pompe à gradient (avec quatre pompes), injecteur automatique, petit ordinateur avec logiciel *Empower 3*, de contrôle et d'un détecteur VIS-UV, avec une colonne C18 (Macherey Nagel 250 / 4,6 Nucleodur), température de la colonne est comprise entre 5 à 40 ° C volume d'injection était de 20 µl pour les extraits de l'échantillon.

3.7.2. Le collecteur (Fraction Collector III)

Contrôlé par ordinateur collecteur conçu pour une utilisation avec des applications HPLC et MS. Compatible avec tous les débits élevés que 300 ml par minute, le collecteur de fractions III gère un large éventail de supports de l'adaptateur et liées à des navires de collecte. Sa conception flexible peut accueillir une variété de tailles de fractions si vous transférez ou la

collecte des plaques de microtitrage (jusqu'à 384 fractions) ou plusieurs conteneurs. Le Collecte de fractions automatisées grâce Waters Empower™ 3 ou logiciels MassLynx™.



Figure 16.Chromatographie liquide à haute performance(HPLC) équipé d'un détecteur photodiodes (PDA) couplé à un collecteur (Fraction Collector III)

3.7.3. Conditions opératoires

Les composés phénoliques sont analysés selon la méthode de Jin *et al* , (2011). Un système solvant à gradient a été réalisé dont le solvant A = 0.1% acide formique dans 10% acétonitrile et le solvant B = 0.1% acide formique dans 90% acétonitrile. L'échantillon est dissout dans le méthanol grade HPLC, puis filtré à travers un filtre millipore 0.22 µm. La séparation a été réalisée à température ambiante sous un débit de 1ml/min, avec un gradient de solvant programmé selon le tableau suivant :

Tableau 1. Programme utilisé en HPLC analytique (temps, le gradient de solvant, débit)

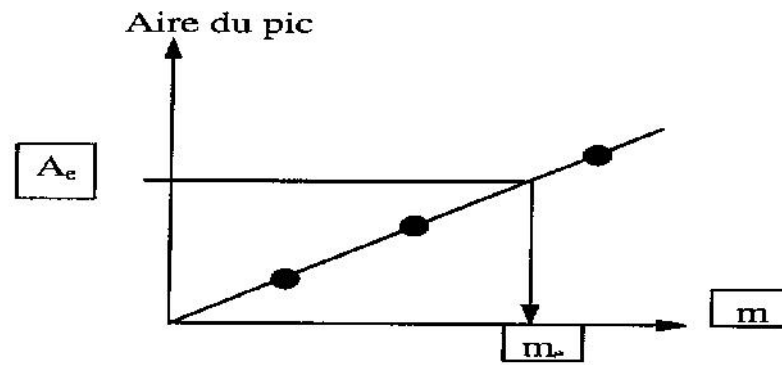
Temps (min)	A%	B%	Débit
0-2	100	0	1ml/min
6	90	10	1ml/min
31	37	63	1ml/min
41	50	50	1ml/min
45	100	0	1ml/min
50	100	0	1ml/min

Le volume d'injection est de 20 μ l, une gamme de 11 standards a été utilisé composé des acides phénoliques et flavonoïdes. Le détecteur a été programmé à un intervalle de longueur d'onde entre 280-325 nm permet de déceler une longueur d'onde optimale pour les acides phénoliques et les flavonoïdes.

3.7.4. Analyse qualitative et quantitative

L'analyse quantitative permet d'identifier les différents constituants d'un mélange. Elle est réalisée par comparaison des temps de rétention (t_R en mn) à ceux d'étalons élués dans les mêmes conditions.

L'analyse quantitative est basée sur le calcul des aires des pics du chromatogramme. Ces aires sont proportionnelles aux concentrations des composés analysés. Pour un composé déterminé, la comparaison de l'aire à celle de l'étalon correspondant permet de le quantifier. A cet effet, une courbe d'étalonnage qui présente l'aire en fonction de la concentration est établie. L'injection ultérieure du même volume (v) de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de déterminer la masse ou la concentration de l'échantillon.



$$A_e / m_e = A_{et} / m_{et}$$

Dont :

A : l'aire des pics

e : l'échantillon

et : l'étalon

m : la masse du produit.

4. Résultats et Discussion

4.1. Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique réalisée sur la zone de collecte « Djebel Chettaba » met en évidence l'usage de *Lycium halimifolium* Mill par les tradipraticiens comme agents antimicrobiens. Au cours de notre enquête, nous avons recensé plusieurs pathologies et infections que les tradithérapeutes traitent avec ses différents organes (racines, feuilles, écorces et fruits) à savoir : la conjonctivite, la cataracte, le cancer, maladies hépatiques, les maux de ventre, les hémorroïdes, et l'inflammation. En outre, Nous avons observé que souvent les tradipraticiens traitaient ces maladies soit par les feuilles seules, soit avec les racines ou conjointement avec d'autres espèces de plantes médicinales et par différentes méthodes.

Pour la conjonctivite et la cataracte, et à titre d'exemple, les majorités des tradithérapeutes préparent une décoction de feuilles de *Lycium* (fraîche ou sec), après l'évaporation et la concentration, l'infusée est administrée par voie oculaire.

Pour les maux de ventre, une infusion de feuilles de *Lycium* avec une petite quantité de menthe est prise deux fois par jour. Par ailleurs, lorsque les feuilles et les fruits sont macérés pendant deux mois dans l'eau, la solution ainsi préparée est préconisée pour le traitement du cancer.

En réalité, la majeure partie de ces observations sur terrain ont fait déjà un sujet de littérature (Lu, 1991 ; Gan, 2001). L'utilisation des feuilles et les graines sont également mentionnées dans quelques livres médicaux (Stuart, 1911). Les préparations de cette plante sont, en particulier, prescrites pour la transpiration nocturne, "vapeur d'os Sensation " et la fièvre chronique de bas niveau, d'ailleurs une décoction de l'écorce de racine est efficace pour traiter la toux et contre l'hémoptysie et l'hématurie (Chen, 2004). Enfin, il est également indiqué pour le traitement du diabète et l'hypertension (Uang, 1999)

Ces activités pourront être liées à la présence des métabolites secondaires de la plante tel que les polyphénols, les coumarines, les tannins, les alcaloïdes qui possèdent des propriétés antimicrobiennes, anticancéreuse, antioxydantes remarquables (Subramanian *et al.*, 2007 ; Sandhar *et al.*, 2011 ; OMS, 2015).

Auterme de cette enquête et d'après la littérature, l'utilisation de cette plante se limitait principalement à l'usage alimentaire et pour l'effet thérapeutique de ses fruits, alors que la phytochimie et l'effet biologique des feuilles demeurent peu étudiées, un point de motivation de cette étude.

4.2. Identification de la plante

L'identification de la plante comme étant le *Lycium halimifolium* Mill a été élaborée par Pr. Khalfallah.N et son équipe de Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétal, de l'Université de Constantine.



Figure 17. Photos de *Lycium halimifolium* Mill dans leur habitat naturel.

4.3. Etude phytochimique

4.3.1. Le criblage phytochimique

Les résultats des tests de criblage chimique réalisés à partir de la poudre des feuilles sont indiqués dans le Tableau2

Tableau2. Screening chimique des extraits de *Lycium halimifolium* Mill

Les métabolites primaires		Feuilles	
Les acides aminés		-	
Protéines		+	
Carbohydrates		++++	

Métabolites secondaires	La feuille	Métabolite secondaire	La feuille
Flavonoïdes	++++	Coumarines	+
Alcaloïdes	++++	Résines	+
Tannins Galliques	++	Les composés réducteurs	+++
Tannins Catéchiques	+++	Les composés volatiles	
Saponines (indice de mousse I _m)	(++++) 100	Anthracéniques	-
Tri terpène et Stérols	++++	Phlobatanins	-

(++++) : Fortement présent ; (++++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif.

L'analyse phytochimique de cette espèce révèle une présence très remarquable des métabolites primaires à savoir ; les carbohydrates, et une faible présence des protéines et absence des acides aminés. Tandis que, les tests des métabolites secondaires ont révélé une forte présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des tannins, des saponines, des composés réducteurs, des triterpènes et stérols et une simple présence de résines ainsi que les coumarines. En revanche, il a été constaté l'absence totale des anthracéniques, des huiles volatiles et les phlobatanins. Ces résultats corroborent ceux développés par plusieurs auteurs qui ont signalé que les feuilles de cette plante est riche en flavonoïdes, en tannins, et en alcaloïdes, suggérant que cette partie de *Lycium halimifolium* Mill est une source privilégiée

de molécules biologiquement actives (Wang, 2010 ; Pungier, 2012 ; Mocanet *al.*,2014 ; Boulilaet *al.*, 2015).

4.3.2. Extraction des flavonoïdes et détermination du rendement de l'extraction

L'extraction a permis d'obtenir quatre fractions différentes à partir de l'extrait brut (hydrométhanolique) à savoir ;les fractions d'éther de pétrole, chloroformique, d'acétate d'éthyle (ACT) et la fraction butanolique (BUT). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque fraction sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 :Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill en pourcentage par rapport au poids total.

Fractions	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Ether de pétrole	Poudreux	Verte	0.679 ±0.037
Chloroformique	Poudreux	Vert noir	3.652 ±0.054
Acétate d'éthyle	Cristaux	Jaune dorés	10.08±0.132
n-butanol	Pâteux	Marron foncé	28.5 ±1.153

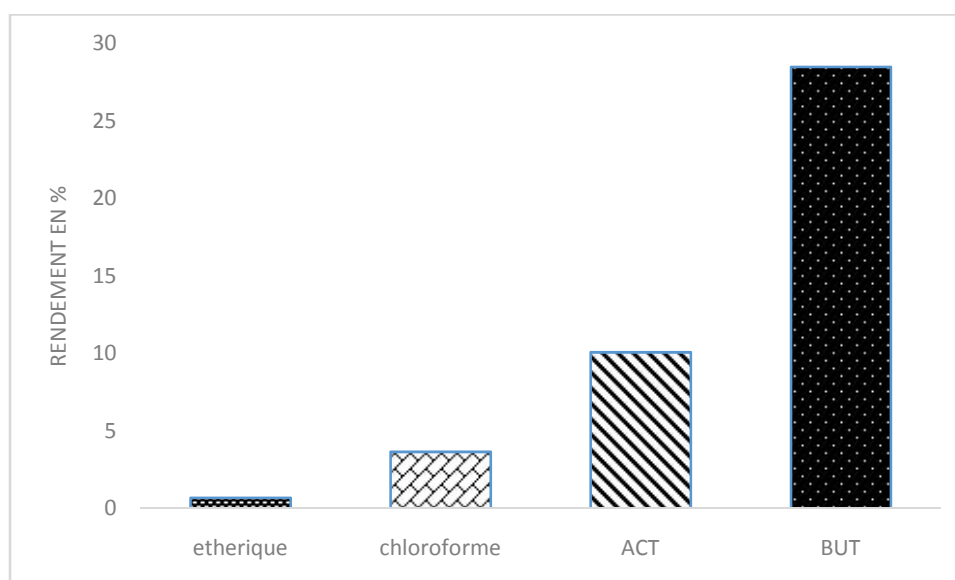


Figure 18. Rendements des extraits des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut, la fraction BUT représente le rendement le plus élevé (28.5 ± 1.153 %), suivi par la fraction ACT (10.08 ± 0.132 %) ensuite par la fraction chloroformique (3.652 ± 0.054 %), et le rendement le plus faible (0.679 ± 0.037 %) est obtenu par la fraction d'éther de pétrole.

Dans la présente étude il a été révélé que la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant l'activité biologique de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Il est à signaler que, quel que soit la méthode d'extraction appliquée, il est recommandé de tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit, préserver la structure chimique initiale des substances.

En plus, la composition chimique d'un végétal varie selon les espèces et au sein de même espèce, elle dépend des conditions de culture (qualité du sol, climat, irrigation, traitements phytosanitaires), de la période de récolte (précoce ou tardive) et la méthode d'extraction (solvants...) (Ozkan, 2002 ; Chynuet *al.*, 2014).

4.3.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques (PPT, FT, TC)

Afin de caractériser les fractions ACT et BUT préparées à partir des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, et les tannins a été effectué quantitativement par spectrophotomètre UV-visible. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés biologiques des plantes leur est attribuées. Le tableau 4 montre les valeurs de PPT, FT et TC de chaque fraction.

Tableau 4 Dosage des composés phénoliques des fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill

Fractions	les polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg PS}$)	les flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg PS}$)	Tannins ($\mu\text{g EC/mg PS}$)
ACT	61.66 ± 0.042	25.18 ± 0.014	5.872 ± 0.053
BUT	60.21 ± 0.102	17.79 ± 0.015	7.058 ± 0.013

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 mesures \pm SD.

La détermination quantitative des polyphénols totaux par le Folin-Ciocalteu montre que la fraction ACT contient $61.66 \pm 0.042 \mu\text{g EAG/mg}$, et est presque la même qui est contenue dans la fraction BUT avec une quantité estimée de $60.21 \pm 0.102 \mu\text{g EAG/mg}$.

Les travaux de Mocan *et al.*, (2014) portés sur la même partie de la même plante (*L. barbarum*) ont montré que la teneur en polyphénols par les feuilles est de $61.59 \pm 1.68 \mu\text{g EAG/mg}$, alors que la teneur des polyphénols des feuilles de l'espèce *Lycium chinense* étudiée par le même auteur, est plus importante et estimée à $80 \pm 2.02 \mu\text{g ER/mg}$.

En revanche, la dernière étude de Mocan *et al.*, (2017), de deux cultivars ; sauvage et cultivé des feuilles de la même plante, a montré des valeurs similaires en termes de teneurs en polyphénols totaux de $11,14 \text{ mg EAG / g}$ et $11,98 \text{ mg EAG / g}$, respectivement.

En outre, une autre étude a montré des teneurs en polyphénols totaux dans les feuilles de *Lycium Intricatum* Boiss de l'ordre de $50.93 \pm 3.36 \text{ mg EAG/g}$ (Boulila *et al.*, 2015).

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols, pour les raisons de la disponibilité du réactif de Folin, la méthode est bien standardisée, en plus, c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité et c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants à travers le monde. En outre, la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée (Huang *et al.*, 2005). Et si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est pas cependant spécifique des polyphénols, car il réagit avec l'acide aminé tyrosine et tryptophane des protéines. De telles interférences peuvent être négligées, car ces acides aminés aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (Djeridane, 2006 ; Boizot et Charpentier, 2006)

Les résultats de la détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèlent que la fraction ACT contient plus de flavonoïdes avec un taux de $25.18 \pm 0.014 \mu\text{g EQ/mg}$ de poids sec, en revanche la fraction BUT renferme un taux moins estimé à $17.79 \pm 0.015 \mu\text{g EQ/mg}$ de poids sec. Des travaux précédents portés sur la même partie de la même plante (*L. barbarum*) ont montré que la teneur en flavonoïdes par les feuilles est plus importante ($43.73 \pm 1.43 \mu\text{g ER/mg}$) alors que les feuilles de *Lycium chinense* contiennent une concentration en flavonoïdes encore plus importante estimée à $61.65 \pm 0.95 \mu\text{g ER/mg}$ (Mocan, 2014).

Les résultats montrent également que les valeurs des polyphénols totaux des deux fractions (ACT et BUT) des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill sont respectivement (61.66 ± 0.95 , 60.21 ± 0.102 $\mu\text{g EAG/mg}$) sont supérieures à celles des flavonoïdes (25.18 ± 0.014 , 17.79 ± 0.015 $\mu\text{g EQ/mg}$). Ceux-ci sont cohérent avec ceux précédemment montrés par Boulila *et al.*, (2015), dont l'extrait méthanolique des feuilles de *Lycium intricatum* L contient une quantité de polyphénols de l'ordre de 50.93 ± 3.36 $\mu\text{g EAG/mg}$, est supérieure à la quantité des flavonoïdes estimée à 14.26 ± 0.94 $\mu\text{g EQ/mg}$.

Ainsi, Les tannins condensés ou prothoanthocianidines, ont été déterminées par la méthode de vanilline en milieu acide. En effet, le tableau montre que la fraction BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill possède une teneur en tannins égale à 7.058 ± 0.013 $\mu\text{g EC/mg}$, cette quantité est supérieure à la fraction ACT (5.872 ± 0.053 $\mu\text{g EC/mg}$).

Les résultats obtenus dans la présente étude ont révélé que le niveau de ces composés phénoliques dans les diverses fractions extraites étaient intéressantes. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car plusieurs facteurs peuvent avoir un impact sur la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques dans les fractions, et plus particulièrement les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique (sécheresse, sol), la période de récolte, le stade du développement, la partie de la plante utilisée, l'espèce, ainsi que, la méthode d'extraction et de quantification (Miliauskas *et al.*, 2004, Ebrahimi *et al.*, 2008). La sélectivité du solvant utilisée peut influencer également sur la teneur en polyphénols, en flavonoïdes totaux et en tannins (Lee *et al.*, 2003).

4.3.4. Caractérisation phytochimique des composés de *Lycium halimifolium*

La caractérisation des composés a été effectuée sur les fractions ACT, BUT en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance équipé d'un détecteur à réseau de photodiodes (HPLC-PDA). En effet, l'identification des composés bioactifs est basée sur la comparaison de temps de rétention des différents composés étudiés à ceux de différents standards utilisés à savoir : acide gallique, acide protocatechique, acide vanillique, acide caféique, acide syringique, acide hydroxybenzoïque, acide coumarique, rutine, quercétine, kaempferol, TBHQ (hydroquinone butylique tertiaire) dans les mêmes conditions.

En outre, la quantification des composés est obtenue en comparant leurs temps de rétention et les surfaces des pics à ceux des standards (fig. 21)

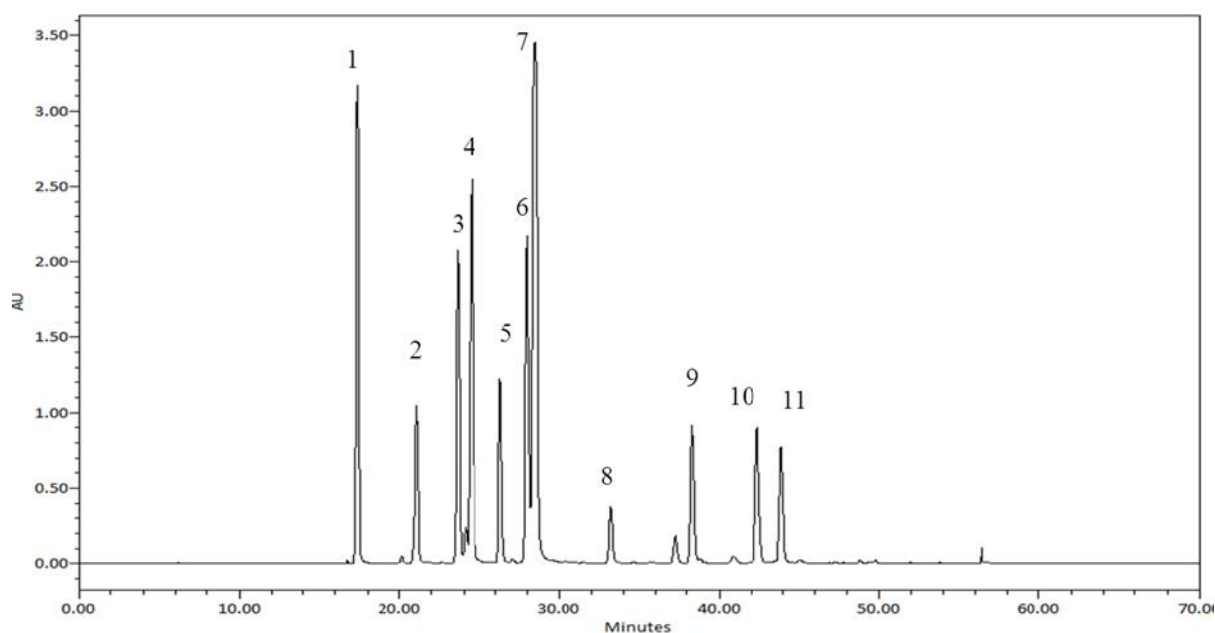


Figure 19. Profil du chromatogramme du mélange des étalons entre 280-325 nm. 1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide caféique, 4: acide syringique, 5: Rutine, 6: a.vanillique, 7 : acide p-coumarique, 8 : a.hydroxybenzoïque , 9 : Quercetine 10: TBHQ: hydroquinone butylique tertiaire, 11: Kaempherol

Le système solvant utilisé dans l'HPLC-PDA est composé d'eau et d'un modificateur organique en l'occurrence, l'acétonitrile (ACN), la phase mobile est souvent acidifiée à un pH entre 2 et 4 afin d'éviter l'ionisation des nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité (Mišan, 2011). Dans ce mode de gradient acétonitrile induit une perte de charge inférieure et une durée d'analyse plus courte par rapport au méthanol. Par conséquent, l'acétonitrile a été sélectionné pour poursuivre le développement à cause de sa meilleure force d'éluion et de sa plus faible viscosité (Michel, 2011).

Les essais réalisés sur la fraction ACT ont conduit à l'obtention de chromatogramme de la figure(20) :

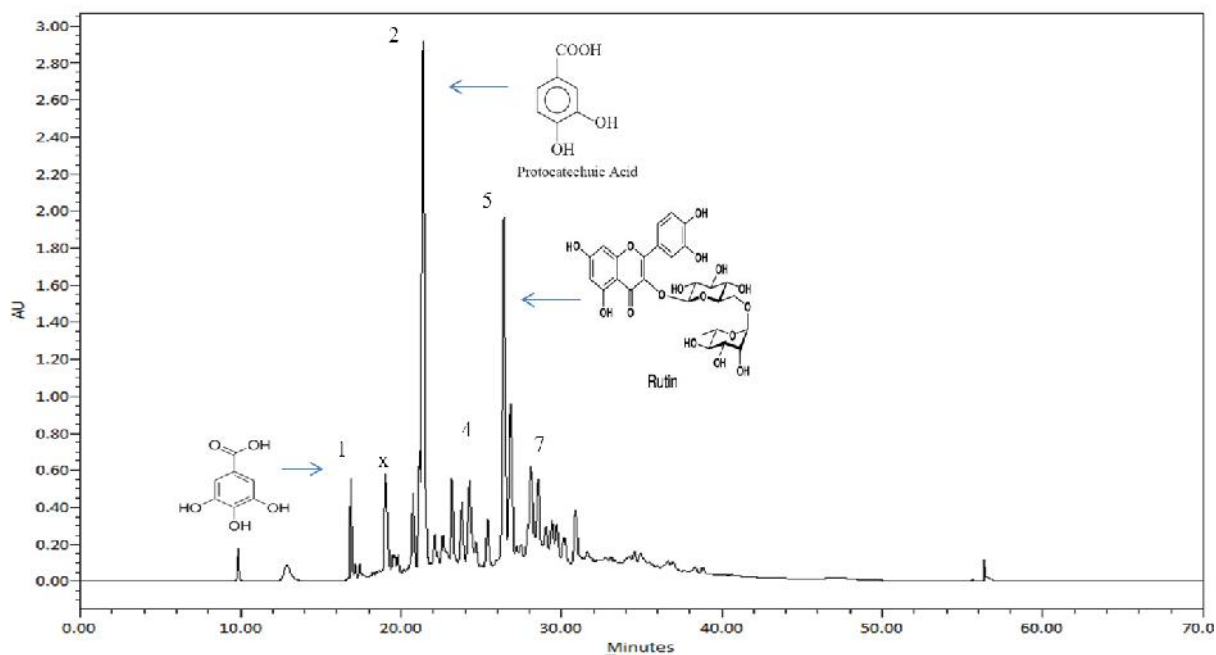
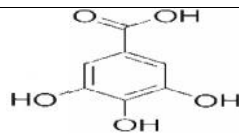
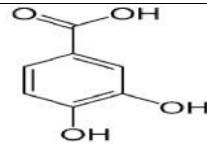
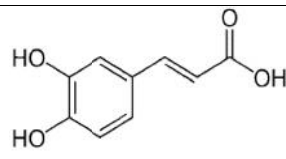
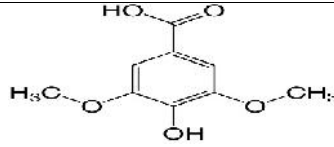
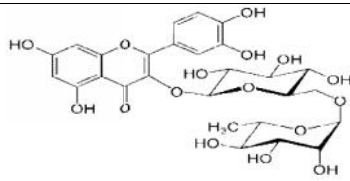
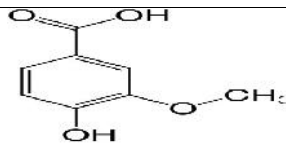
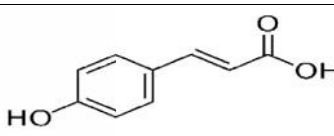
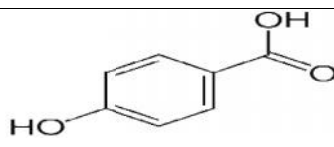
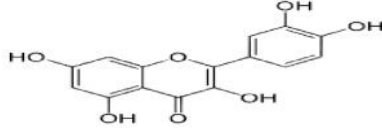
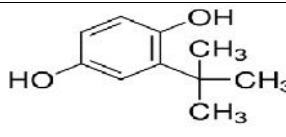
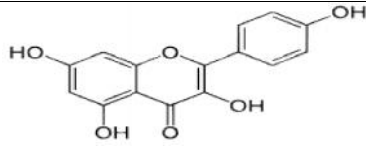


Figure 20. Chromatogramme obtenu entre 280-325nm de la fraction ACT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill

Le chromatogramme obtenu (Figure 20) révèle la présence de plus de 20 pics, et la comparaison des temps de rétention des composés extraits avec ceux des standards, a permis de prétendre la présence de 5 composés, il s'agit de quatre acides phénoliques : a.protocatechique à un taux estimé à 19.29%, suivi par a. gallique présent à 0.499%, ensuite, a. coumarique, a.syringique et un flavonoïde (la rutine) détectés à des pourcentages ; 0.386%, 0.142%, 12.58 %, successivement .

Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques identifiés dans la fraction ACT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill sont récapitulés dans le tableau 5

Tableau 5. Analyse quantitative et qualitative de la fraction ACT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

Pic	T _R (min)	ACT (%)	Nom du composé	Structure chimique
1	17.36	0.499	a. Gallique	
2	21.08	19.29	a. Protocatechique	
3	23.65	-	a.Caféique	
4	24.49	0.142	a.Syringique	
5	26.30	12.58	Rutine	
6	27.95	-	a.Vanillique	
7	28.46	0.386	a. Coumarique	
8	33.21	-	a.Hydroxybenzoïque	
9	38.31	-	Quercetine	
10	42.37	-	TBHQ	
11	43.87	-	Kaempherol	

Les essais réalisés sur la fraction BUT ont conduit à l'obtention de chromatogramme de la figure (21) :

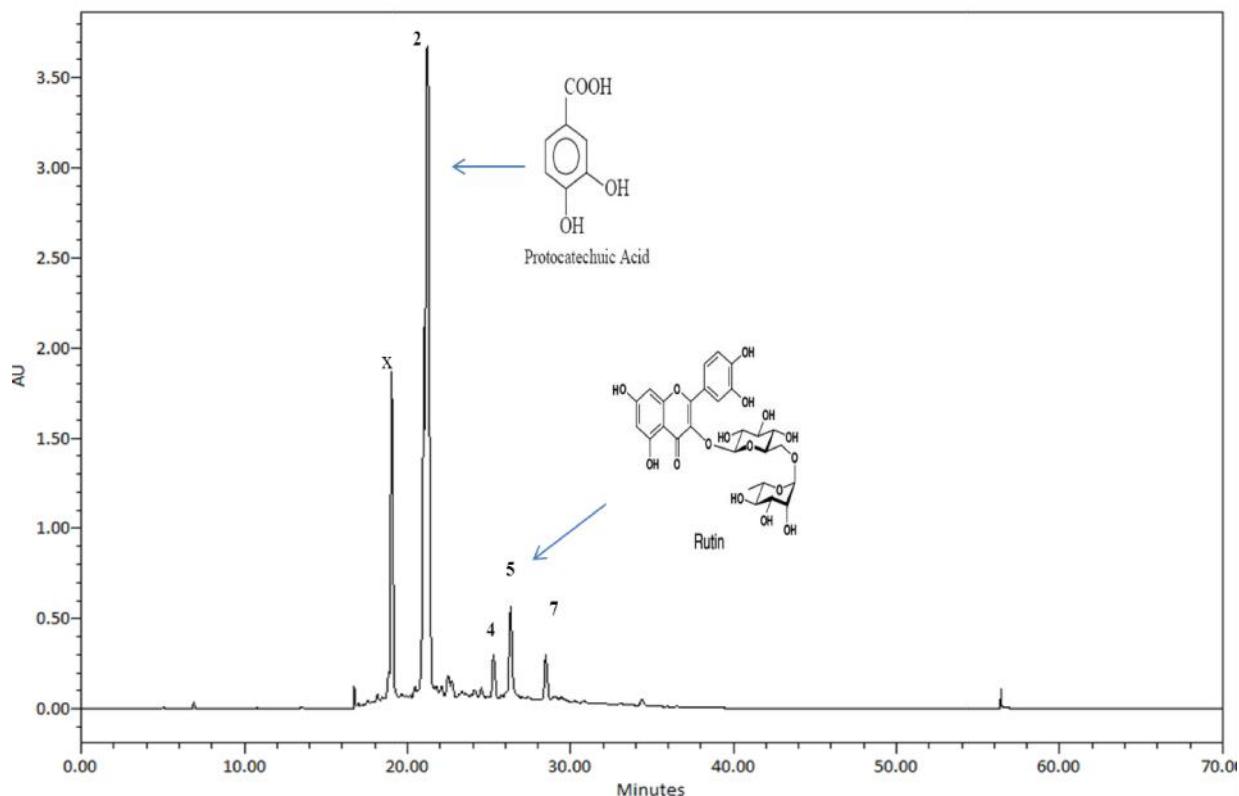
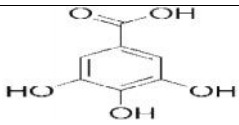
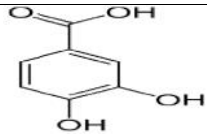
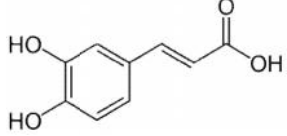
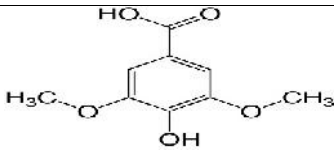
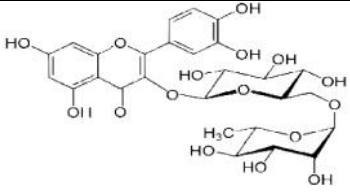
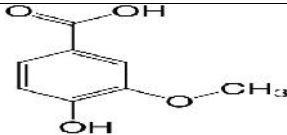
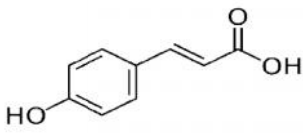
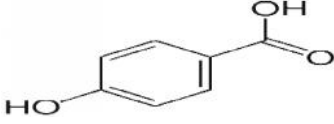
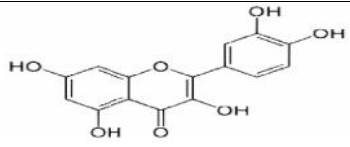
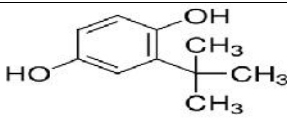
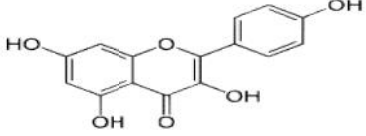


Figure21. chromatogramme obtenu entre 280-325nm de la fraction BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

Les essais réalisés sur la fraction BUT (Figure 21) ont conduit à l'obtention de plus de 7 pics, 4 composés sont ainsi identifiés, il s'agit de trois acides phénoliques : l'acide protocatechique avec un taux de 20.32%, suivi par l'acide syringique présent à 0.236%, et l'acide coumarique qui a été détecté à 0.124%, et un flavonoïde (la rutine) dont le taux est estimé à 2.098%. Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques identifiés dans la fraction BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau6. Analyse quantitative et qualitative de la fraction BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill

Pic	T _R (min)	BUT (%)	Nom du composé	Structure chimique
1	17.36	-	a. Gallique	
2	21.08	20.32	a. Protocatechique	
3	23.65	-	a. Caféique	
4	24.49	0.236	a. Syringique	
5	26.30	2.098	Rutine	
6	27.95	-	a. Vanillique	
7	28.46	0.124	a. coumarique	
8	33.21	-	a. Hydroxybenzoïque	
9	38.31	-	Quercetine	
10	42.37	-	TBHQ	
11	43.87	-	Kaempherol	

4.3.5. Analyse des profils des chromatogrammes

L'analyse des fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill a montré que l'acide protocatechique est le composé phénolique majoritaire avec des teneurs considérables estimés à 19.29% pour la fraction ACT et à 20.32% pour la fraction BUT. En plus, les résultats montrent que la fraction ACT est riche en rutine avec un taux de 12.58%, et que la fraction BUT contient la même molécule à une concentration moindre estimée à 2.098%. Ces résultats corroborent ceux développés par Donget *et al.*, (2009), qui ont montré que la rutine est la principale flavonoïde trouvée dans les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, et ceux révélés récemment par Mocan *et al.*, (2017), qui ont montré que la rutine étant parmi les composés dominants dans les deux cultivars sélectionnés de cette espèce, où la teneur en rutine dans les feuilles est estimée entre 1430.60 ± 41 et 9339.17 ± 112 $\mu\text{g/g}$ du poids sec.

En outre, les deux fractions ACT et BUT contiennent l'acide coumarique, acide syringique avec des teneurs variables. Inbaraj *et al.*, (2010) et Wu, (2012) ont montré également que l'acide -coumarique et les dérivés de l'acide -coumarique étaient présents dans le genre *Lycium*. Par conséquent, l'acide gallique a été identifié seulement dans la fraction ACT en notant l'absence totale de l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide hydroxybenzoïque, quercétine et le kaempferol dans les feuilles. Par ailleurs, les travaux réalisés par Boulila *et al.*, (2015) affirment que les feuilles du genre *Lycium* contiennent de l'acide chlorogénique, la quercétine, Kaempferol, et que le kaempferol était le seul tétrahydroxyflavone détecté chez le genre de *Lycium*, ce qui n'a pas été détecté dans cette étude. Par ailleurs, des études ont identifié d'autres composés phénoliques mais qui n'ont pas été testés dans cette étude tels que ; l'acide dicaféylquinique, acide chlorogénique, et l'acide ferulique (Inbaraj *et al.*, 2010 ; Mocan *et al.*, 2014 ; Bondia-Pons *et al.*, 2014; Boulila *et al.*, 2015). En comparaison avec la littérature, les résultats sont en bon accord avec les recherches qui ont montré que les extraits de genre *Lycium* sont riches en composés phénoliques (Mocan, 2014 ; Cyboran *et al.*, 2014 ; Boulila *et al.*, 2015),

En conclusion il est à signaler que ce travail a permis pour la première fois d'identifier l'acide protocatechique, acide syringique et l'acide gallique dans les fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill. En outre, cette plante est considérée comme étant riche en composés bioactifs, orientées vers l'obtention de phytomédicaments, et peuvent être une matière première prometteuse pour être utilisée dans des aliments fonctionnels.

Chapitre III

Caractérisation de l'aflatoxine B1 et étude de Activité biologique *in vitro*

1. Introduction

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, porte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et, pour la protection de l'économie du pays d'autre part.

Une grande diversité de denrées agricoles peut être contaminée par les mycotoxines, mais ce sont, surtout, les productions céréalières, maïs et les arachides qui constituent les principaux vecteurs de la contamination par l'aflatoxines chez l'animal.

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation des fongicides chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les moisissures nuisibles (Magan et Olsen, 2004). Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la biosphère, de la chaîne alimentaire, et l'apparition des microorganismes résistants. Il est devenu très indispensable de rechercher des molécules naturelles, en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité ; pouvant actionner un effet inhibiteur ou de prévention sur ces champignons ou leurs métabolites.

L'utilisation des composés naturels dans la lutte contre les moisissures des arachides, en particulier, la sécrétion de ses métabolites hautement toxiques pour le consommateur. En effet, l'objectif de ce chapitre consiste à rechercher l'effet des fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill obtenues précédemment sur le développement de l'*Aspergillus flavus* et la sécrétion de l'aflatoxine B1. Pour ce faire, une souche aflatoxinogène de cette moisissure est sélectionnée à partir des arachides collectées de la région d'El teref, étudiée morphologiquement et identifiée par voie moléculaire.

2. Synthèse bibliographique

2.1-Contamination des arachides

La contamination des graines d'arachide par un champignon aflatoxinogène est une condition indispensable mais insuffisante à la production d'aflatoxine. L'aflatoxinogénèse peut intervenir avant la récolte, dans le sol, après la récolte, pendant le séchage et durant le stockage (Martin et *al*, 1999 ; Wiu, 2014).

L'arachide est un produit relativement hygroscopique pouvant se réhydrater pendant le stockage. Une reprise d'humidité suffisante conduit généralement au développement de moisissures du genre *Aspergillus*, largement présentes dans l'inoculum du stock d'arachide (Martin et *al*, 1999). La réhydratation des arachides peut intervenir à partir de l'eau atmosphérique ou par transfert de vapeur d'eau au sein du stock entre les points chauds et les points froids (Rouziere, 1996 ; Coker, 1996).



Figure 22. La contamination des arachides par l'*Aspergillus flavus*(1)

2.2.Conditions de production des aflatoxines par les *Aspergillus*

Le développement des moisissures du genre *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* et *A. pseudotamari*) et la production des aflatoxines dans les arachides, sont dû aux mauvaises conditions de productions et de conservations de cet aliment. L'inadéquation des facteurs d'humidité, de température, et la durée de stockage peuvent faire ressortir le potentiel toxigène de ces moisissures (Dilkin, 2002).

Pour l'*Aspergillus flavus*, la température optimale de croissance est comprise entre 25 et 35°C (l'optimum est 33°C), mais cette moisissure peut se développer bien dans un intervalle plus large (15-45°C) et parfois jusqu'à 50°C (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). En outre, elle se développe à 0,97 a_w, avec un pH entre 2,1-11,2, et dans une atmosphère qui contient 61,7% de CO₂, 8,7% de O₂ et 29,7% de N₂ (Tabuc, 2007).

Tandis que les conditions les plus favorables à la production d'aflatoxines sont ; une activité en eau relativement faible (0,84 - 0,86) et une température élevée, comprise entre 25 et 40 C° (Pfohl-Leszkowicz, 2001; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Ces conditions sont réunies dans la région prospectée pour l'échantillonnage de ce travail.

2.3. Impact des aflatoxines

2.3.1. Impact sur la santé

L'AFB1 est classée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer dans le groupe 1, comme un cancérogène potentiel chez l'homme et les animaux surtout comme le carcinome hépatocellulaire. En effet, cette substance est considérée comme un puissant mutagène qui endommage des cellules hépatiques (IARC, 2002). Plusieurs études sur l'être humain ont rapporté que l'AFB1-8,9-époxyde provoque une augmentation le facteur de nécrose tumorale alpha circulant, suggérant que ces mycotoxines sont immunotoxiques. Du fait, l'AFB1 est un mycotoxine reconnue comme étant cancérogène, immunosuppresseur, oestrogène, et tératogène.

2.3.2. Impact sur l'économie

L'aflatoxine B1 peut être à la base d'énormes pertes économiques à l'agriculture et aux industries agroalimentaires (Thrasher *et al.*, 2012 ; Toffa, 2015).

L'impact financier de ces dernières concernent non seulement les risques pour la santé de l'homme et les animaux domestiques, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation, cependant, peu de travaux ont étudiés l'impact financier et économique des aflatoxines sur des populations spécifiques aussi bien dans les pays industrialisés que les pays développés (Zinedine, 2004).

L'importance de la contamination des produits par les aflatoxines est fonction de la nature du produit, de l'année et de la région. En général, les produits de la récolte les plus affectés

économiquement par les aflatoxines sont : le maïs, l'arachide et le coton (Chandrashekhar, 1989).

En Afrique, les pertes économiques des céréales et arachides, ont été récemment estimées à 16 millions de dollars US par an et la majorité de ces pertes peut être attribuée à la croissance fongique et la contamination par les mycotoxines (Toffa, 2015).

2.4. Lutte contre l'aflatoxine et la décontamination

Les procédés physiques, chimiques et biologiques, constituent les trois stratégies de lutte contre les aflatoxines les plus courantes. Ces procédés de décontamination sont efficaces, simples à mettre en œuvre et peu coûteux (Park, 1993).

2.4.1. Procédés physiques

Les méthodes physiques sont nombreuses, elles sont basées en général sur le lavage, le séchage, le broyage, la séparation mécanique, le traitement par un choc thermique et la torréfaction.

2.4.1.1. Traitement thermique

Les mycotoxines sont en général thermostables et elles résistent à tous les procédés utilisés pour l'élimination des micro-organismes (chauffage et stérilisation). Peers et Linsell, (1975) observaient que les aflatoxines restent stables dans les arachides après un chauffage à 200°C pendant 30 minutes. Il est à noter que les traitements thermiques dépendent en grande partie d'autres facteurs telle la teneur de l'aliment contaminé en eau et de son pH (Rustom, 1997 ; Abdellah, 2004 ; Toffa, 2015).

2.4.1.2. Irradiation

L'irradiation a été considérée pour longtemps comme une solution possible de lutter contre les microorganismes. Cette méthode peut être envisagée pour lutter contre les moisissures toxigènes (Zinedine, 2004).

2.4.1.3. Extraction

L'extraction des aflatoxines avec des solvants est un procédé qui a été étudié pour l'élimination des arachides contaminées. Cependant le matériel traité par cette méthode ne peut

être destiné qu'aux animaux. Quoique toutes les traces d'aflatoxines puissent être éliminées sans aucun risque de formation de produits toxiques, ce procédé reste limité dû à son coût très élevé (Rustom, 1997).

2.4.1.4. Adsorption

L'utilisation des produits possédant des propriétés d'adsorption ont fait l'objet d'études pour éliminer les mycotoxines des aliments contaminés (Firmin, 2011). Selon Huwig *et al.*, (2001), différents adsorbants ont été utilisés avec succès dans des procédés de détoxification des aliments de bétail contaminés par les mycotoxines, tel que l'argile adsorbant les aflatoxines en particulier l'AFB1, le charbon actif adsorbant la plupart des mycotoxines et d'autres polymères.

2.4.2. Procédés biologiques

Karlovsky, (1999) a rapporté la possibilité de dégradation des mycotoxines en particulier l'OTA, l'AFB1, la DON et la ZEN par la flore du tractus digestif des ruminants (porc, bovins). Selon Bhatnagar, (1991), la détoxification biologique des mycotoxines consiste en une transformation ou une dégradation enzymatique des toxines en produits moins toxiques.

2.4.3. Procédés chimiques

De nombreuses études ont évalué la capacité des substances chimiques à inactiver ou réduire certaines mycotoxines, cependant la plupart des études ont été axées sur les aflatoxines dans l'alimentation animale.

2.4.3.1. Traitement à l'ammoniaque

Le traitement à l'ammoniaque est une solution pratique et efficace pour la détoxification des aflatoxines dans les denrées alimentaires et l'alimentation du bétail (Park, 1993). Cependant la FDA "Food and Drug Administration" n'autorise pas ce type de traitement comme solution de réduction des taux d'aflatoxines dans les aliments. L'inconvénient majeur de cette technique est le refus des aliments traités par le bétail.

2.4.3.2. Bisulfites

Les bisulfites ont été ajoutés aux aliments pour inhiber les activités de certaines enzymes mais pour retarder également la croissance des micro-organismes. Doyle et Marth, (1978) ont

constaté que les bisulfites réduisent les taux des aflatoxines B1 et G1 d'environ 50 % après environ 5 jours de traitement et que cette durée peut être réduite en une journée si la température atteint 55° C au cours du procédé de traitement.

2.4.3.3. Les antioxydants

Grâce aux connaissances acquises sur les voies de biosynthèse des toxines, certaines molécules présentes dans les végétaux (les polyphénols) s'avèrent, de par leur structure et propriétés antioxydante, être de bons candidats susceptibles d'interférer avec la production de toxines (Reddy, 2009). Plusieurs études ont montré l'effet remarquable antifongique et aflatoxinogène lié à leur richesse en composés bioactifs largement répandus dans les plantes médicinales (Banso et Adeyemo, 2007 ; Gacem, 2011 ; Maristela *et al*, 2014 ; Neveen *et al*, 2015).

Les vitamines (A, D et E) et le sélénium ont donné également des résultats positifs en inhibant la complexation des mycotoxines à l'ADN. Des résultats similaires ont été obtenus avec les riboflavines et des caroténoïdes (Galvano *et al.*, 2001).

3. Matériel et méthodes

Cette partie a été réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), et le Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) à l'université de Liège en Belgique.

3.1. Test de l'activité antifongique

3.1.1. Technique de dilution en milieu solide

La méthode de dilution en milieu solide a été utilisée pour effectuer un premier screening sur les fractions à une concentration unique de 2.5 mg/ml. Ce test préliminaire (test présomptif) a pour objectif d'identifier les fractions actives (Batawila *et al.*, 2002 ; Agban, 2013).

La méthode consiste à prélever 600 µl de chacune des fractions ; acétate d'éthyle, n-butanol à différentes concentrations (2500, 1250, 625, 312,156 et 78 µg/ml), est ajouté à 20 ml d'un milieu PDA tiède. Après homogénéisation, le mélange est versé dans des boîtes de Pétri. L'ensemencement de *Aspergillus flavus* sur gélose est réalisé par piqûre centrale. Les boîtes de Pétri (témoins et essais) sont incubées pendant 7 jours à 27° C. La croissance de la moisissure est relevée quotidiennement. Si les colonies se développent normalement, le produit n'a pas d'activité antifongique. Inversement, si la croissance fongique est inhibée, nous en déduisons que le produit a une activité antifongique.

Une mesure des diamètres de différentes colonies est réalisée à la fin pour calculer le taux d'inhibition I% (Kordali, 2003).

$$I (\%) = (dC-dE) / dC \times 100.$$

I (%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes témoins positifs

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait.

L'évaluation de l'efficacité des fractions sur une ou plusieurs souche(s) donnée(s) est exprimée par la proportion de celles ayant présentées un taux d'inhibition supérieur ou égal à 50%.

Tous les essais ont été effectués en trois répétitions.

3.1.2. Technique de dilution en milieu liquide

Cette technique comporte deux étapes : la première permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et la seconde détermine les concentrations minimales fongicides (CMF) et les concentrations fongistatiques (CFS). La technique suivie se base sur celles des travaux d'Alcamo, (1984) et de Rotimi *et al.*, (1988).

3.1.2.1. Détermination des CMI

Les différentes concentrations (2500, 1250, 625, 312,156 et 78 µg/ml) ayant eu des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50% sont effectués. En effet, 100 µl de chaque fraction avec différentes concentrations sont ajoutés à 900 µl du milieu PDB (potato dextrose broth) stérile contenant l'*Aspergillus flavus* (10^5 spores/ml). Les tubes ainsi préparés sont incubés à 27° C pendant 7 jours. Après l'incubation, les tubes repérés ne présente aucune croissance de moisissures (la CMI : c'est la concentration minimale qui ne présente aucune croissance des moisissures).

3.1.2.2. Détermination des CMF et CFS

Après avoir repéré les tubes dans lesquels aucune croissance de moisissures n'est constatée, l'expérimentation est poursuivie dans de nouveaux tubes identifiés. Dans chaque tube, est introduit 950µl de milieu PDB, puis 50µl d'un essai déterminé ayant présenté une inhibition totale. La même chose se réalise dans les tubes témoins. Après 7 jours d'incubation, les subcultures dans lesquelles il n'y a aucune reprise de croissance sont remarqués : une détermination des concentrations minimales fongicides (CMF) est ainsi faite. Les concentrations des extraits des subcultures pour lesquelles il y a une croissance comme étant les concentrations fongistatiques sont notées (CFS)(Alcamo, 1984).

3.2. Evaluation de l'activité antimycotoxinogène

3.2.1. Activité mycotoxinogène

Afin de confirmer la production des mycotoxines par la souche cible *Aspergillus flavus*, des disques coupés à l'aide d'un perforateur, contenant des colonies de sept jours de ce dernier, ont été déposés sur une gélose Mueller-Hinton (MH) (Annexe3) préalablementensemencée par des bactéries test en l'occurrence ;*E. coli* et *Staphylococcus aureus*. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 heures. L'activité est détectée par la présence d'une zone claire autour des disques.

3.2.1.1. Préparation de la suspension sporale

Les spores d'*Aspergillus flavus* (ensemencée sur milieu PDA coulé dans des boîtes de pétri pendant 7 jours), sont récupérées par addition d'une quantité d'eau physiologique stérile, la solution obtenue est récupérée à l'aide d'une pipette stérile.

3.2.1.2. Fermentation liquide

Afin de mettre en évidence l'activité mycotoxinogène, 50 ml de milieu YES (Annexe 3) (Frisvad et Filtenborg, 1983), ont été mis dans des flacons de 250 ml, ensuite, les flacons sont stérilisés dans l'autoclave à 120°C pendant 15 min. L'inoculation a été effectuée en ajoutant 1 ml d'une suspension sporale (10^5 spores/ml) de la souche ciblée d'*Aspergillus flavus*. Les flacons ont été incubés à l'obscurité pendant 14 jours à 25 ° C avec agitation manuelle journalière. Après la période d'incubation, la croissance de la moisissure a été visuellement examinée.

3.2.1.3. Détermination du poids de mycélium

Après la période d'incubation, les mycéliums contenus dans les flacons sont filtrés par un papier Whatman N ° 1, et lavés avec de l'eau distillée. Ensuite, ils ont été placés sur des boîtes de Pétri préalablement pesées et laissées se sécher à 50 ° C pendant 6 h, puis à 40 ° C pendant une nuit. Le poids sec du mycélium a été déterminé par la suite (Deabes, 2011).

3.2.1.4.Extraction d'Aflatoxine B1

Afin de pouvoir extraire les mycotoxines produites, le filtrat obtenu est additionné à des différents volumes de chloroforme en trois phases : la 1^{ère} phase (100ml), la 2^{ème} phase (50ml) et la 3^{ème} phase (30ml) et ce, pour un volume de 50 ml du filtrat. Dans la première phase le mélange a été mis dans des ampoules à décanter et agité pendant 10 min. après séparation de phases, la phase aqueuse a été reprise de nouveau dans 50ml de chloroforme et l'opération de mélange et de décantation a été répétée, la phase aqueuse a été reprise dans 30 ml d chloroforme pour extraire la totalité de la mycotoxine (figure). La phase chloroformique ainsi obtenue appelé Aliquote de mycotoxine brute (**AMB**) est filtrée sur du papier Wattman N° 01 puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor (50°C) jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 à 3 ml (indice d'une évaporation achevée) (Gacem, 2011).

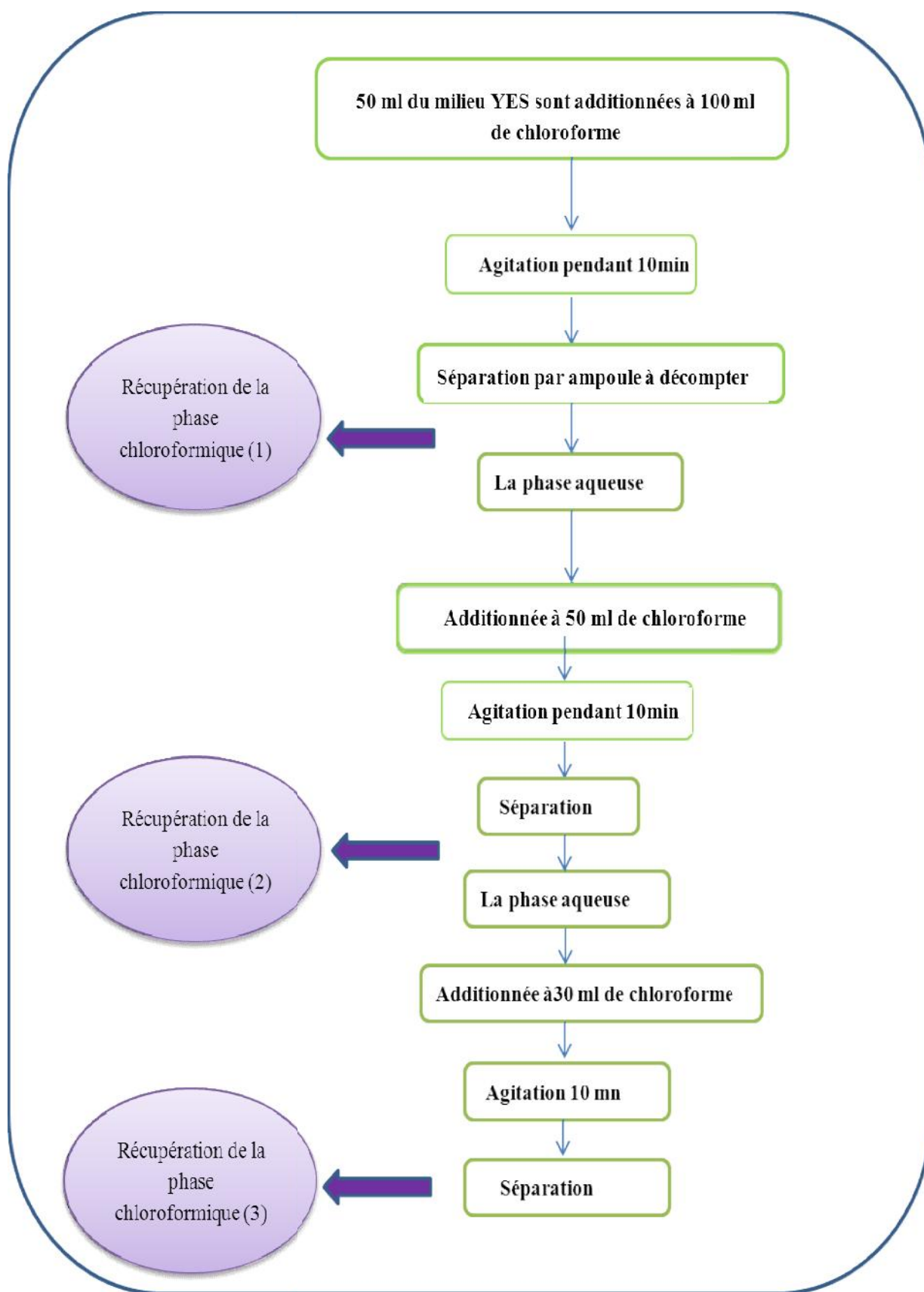


Figure 23. Méthode d'extraction des aflatoxines.

3.2.1.5.Séparation chromatographique

La séparation a été faite sur une plaque de gel de silice (gel de silice 60 F254). Pour ce faire, des spots de 20 µl d'aliquote de mycotoxine brute et 5µl de solution standard d'aflatoxine B1 ont été déposés sur la même ligne de la même plaque (ligne de dépôt) (**figure 24**). La plaque a été, ensuite, placée verticalement dans une cuve chromatographique contenant le solvant d'éluant constitué de toluène, d'acétate d'éthyle et d'acide formique de volume (20 /16 /4) respectivement. La plaque est déposée de telle façon que la ligne de dépôt soit en parallèle avec le front de migration du solvant. Après migration et évaporation du produit d'éluant à sec, la plaque est examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence d'aflatoxine se traduit par des fluorescences caractéristiques aux spots standards et d'un même R_f (Rapport frontal) que l'étalon (Multon, 1982).

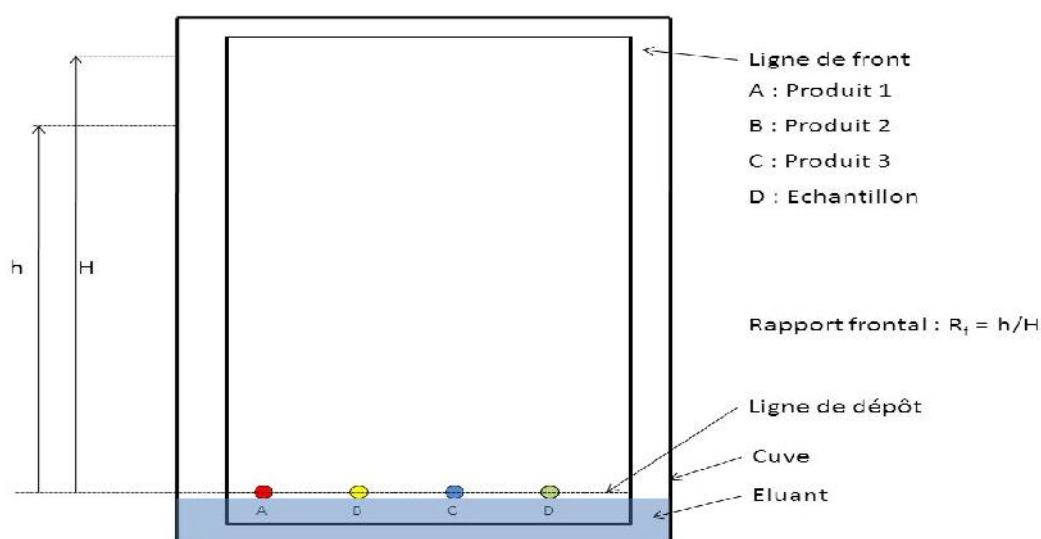


Figure 24.Chromatographie sur couche mince

3.2.1.6. Analyse qualitative et quantitatives de l'aflatoxine B1 par HPLC-PDA

Cette technique a été réalisée au centre d'ingénierie des protéines (CIP), Université de Liège-Belgique. Les mycotoxines ont été analysées par la méthode de Frisvad et Thrane, (1987), avec quelques modifications.

3.2.1.6.1. Appareil HPLC-PDA

Le système de HPLC consistait Waters e2695 séparations Modules, équipé d'un détecteur à réseau de photodiodes (PDA), une pompe à gradient (avec quatre pompes), injecteur automatique, petit ordinateur avec logiciel Empower 3, de contrôle et d'un détecteur VIS-UV, avec une colonne C18 (Macherey Nagel 250 / 4,6 Nucleodur), température de la colonne est comprise entre 5 à 40 ° C volume d'injection était de 20 µl pour les extraits de l'échantillon.

3.2.1.6.2. Le collecteur (Fraction Collector III)

Contrôlé par ordinateur collecteur conçu pour une utilisation avec des applications HPLC et MS. Compatible avec tous les débits élevés que 300 ml par minute, le collecteur de fractions III gère un large éventail de supports de l'adaptateur et liées à des navires de collecte. Sa conception flexible peut accueillir une variété de tailles de fractions si vous transférez ou la collecte des plaques de microtitrage (jusqu'à 384 fractions) ou plusieurs conteneurs. Le Collecteur de fractions automatisé grâce Waters Empower™ 3 ou logiciels MassLynx™

3.2.1.6.3. Le standard d'aflatoxine B1

L'aflatoxine est un standard fournis par NOVAKITS (Tests et Standards contaminants), sa pureté est de 99,7%, de formule : C₁₇H₁₂O₆, avec une couleur blanche, code de produit est : STD-AFB1-P1

3.2.1.6.4. Condition opératoire

Les mycotoxines sont analysés selon la méthode de Frisvad et Thrane, (1987). La séparation des mycotoxines a été réalisé avec un système solvant à gradient, où le solvant A = 10 ml / l de TFA et le solvant B = acétonitrile. L'échantillon est dissout dans le méthanol grade HPLC, puis filtré à travers un filtre millipore stérile 0.22µm. La séparation a été réalisée à température

ambiante sous un débit de 2 ml/min, avec un gradient de solvant programmé selon le tableau suivant :

Tableau 7. Programme utilisé en HPLC analytique (temps, gradient de solvant, débit)

Temps (min)	A%	B%	Débit
0	90	10	2mL/min
30	50	50	2mL/min
34	10	90	2mL/min
36	90	10	2mL/min

Le volume d'injection est de 20 µL. Le détecteur a été utilisé à une longueur d'onde de 254nm.

3.2.2. Activité antimycotoxinogénèse

Afin d'étudier l'effet des deux fractions (ACT et BUT) des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill comme inhibiteurs de la synthèse de l'aflatoxine B1 produite par l'isolat ciblé, trois flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu liquide YES ont été additionnés de 1 mg de la fraction ACT, trois autres flacons ont été ajoutés de 1 mg de la fraction BUT et les trois derniers flacons ont été gardés sans traitement et ont servi de groupe témoin. Tous les flacons ont été inoculés avec 1 ml d'une suspension de spores (10^5 spores / ml) d'une culture jeune de la souche, les flacons ont été incubés pendant 14 jours à 25 ° C avec agitation manuelle par intermittence.

3.2.3. Détermination du poids de mycélium et la détection l'aflatoxine B1 par CCM et HPLC-PDA

Les mêmes étapes citées précédemment ont été réalisés. Le poids de mycélium a été déterminé après un séchage sur boîtes de Pétri de 50 °C pendant 6 h, puis à 40 °C pendant une nuit. En outre l'extraction par chloroforme a donné trois extraits chloroformiques : Aliquote de mycotoxine brute (**AMB**), l'extrait chloroformique de la fraction d'acétate d'éthyle (**ACT**), et l'extrait chloroformique de la fraction de butanol (**BUT**), ensuite 20µl de chaque extrait chloroformique et 5 µl de la solution standard de l'aflatoxine B1 ont été soumis à un système

de chromatographie sur couche mince (CCM). Tous les essais ont été effectués en trois répétitions.

La confirmation de l'inhibition de l'aflatoxine B1 a été effectuée par la technique de Chromatographie en phase liquide à haute performance équipé d'un détecteur de matrice photodiode (HPLC-PDA).

3.3. Autres activités

3.3.1. Test de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de la fraction l'acétate d'éthyle (ACT), le n-butanol (BUT) et les autres sous fractions ont été déterminées par la méthode de diffusion sur gélose cité par Trekiet *al.*, 2009.

3.3.1.1. Les micro-organismes étudiés

Trois souches fournis par le laboratoire de Mycologie Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM), Constantine ont été testés : Gram négative ; *Escherichia coli* (CIFA-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), et à Gram positif ; *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), et d'autres bactéries cliniques tels que *Bacillus sp*, *Serratiasp*, *Acetobactersp*, fourni par laboratoire de bactériologie de Constantine CHU.

3.3.1.2. Le principe

Les différentes souches bactériennes ont été sous-cultivées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour obtenir une culture jeune et les colonies isolées ont été utilisés par la suite pour préparer l'inoculum par trempage dans des tubes de solution d'eau distillée stérile pour avoir un densité cellulaire initiale de la turbidité ou de la région de la 0,5 McFarland. Après ajustement de la turbidité de la suspension de l'inoculum, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension et l'étalement de la surface entière de la gélose Mueller Hinton (GMH) (Annexe 3) a été effectué à trois reprises. Après chaque application, la boîte est tournée 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, à l'aide d'une pince, des disques de papier Wattman stérile (diamètre 6 mm) ont été imprégnés avec les 1mg des deux fractions (ACT, BUT) sur la surface du support

GMH. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Tous les tests ont été effectués sur trois répétitions.

3.3.2. Test de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. Dans notre étude nous avons utilisé l'effet scavenger sur le radical 2,2diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

3.3.2.1. Effet capteur du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH)

Pour dépister l'activité antioxydante des feuilles de *Lycium halimifolium Mill*, le test au DPPH a été utilisé selon le protocole décrit par YuCao *et al.*, (2009), Nazninet *et al.*, (2009). Le DPPH, est un radical libre de couleur violette, est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires (Molyneux, 2004).

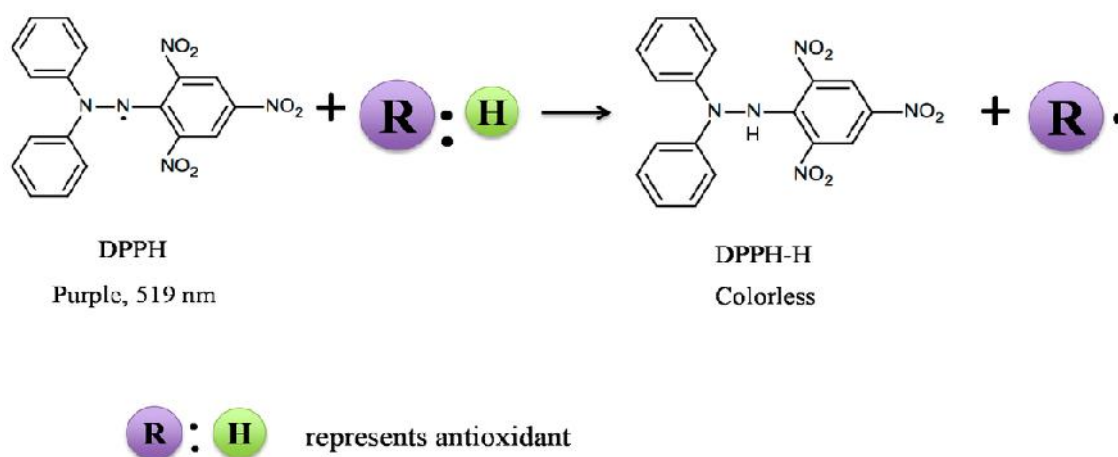


Figure 25. Mécanisme d'action de DPPH.

Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényle picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényle picryl hydrazyl, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Dans des tubes à essais, 0.1 ml de chaque fraction (ACT, BUT) est introduite avec 3 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.04%). Un tube standard est préparé avec la quercitine, après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Dont:

I%: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%)

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon

Abs controle : Absorbance du Contrôle négatif

En modifiant les concentrations des fractions et en calculant les pourcentages d'inhibition, il est nécessaire d'établir une courbe de régression linéaire qui relie les différentes concentrations et les pourcentages d'inhibition.

A partir de cet abaque, on détermine l'IC₅₀ qui correspond à la concentration de l'échantillon qui entraîne 50% d'inhibition. Notons que l'activité anti-oxydante est inversement proportionnelle à la valeur de l'IC₅₀. Ainsi, l'échantillon qui présente l'IC₅₀ la plus faible est celui qui présente l'activité anti-radicalaire la plus importante.

Tous les tests ont été effectués sur trois répétitions.

3.4. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs d'IC₅₀ et EC₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Le logiciel utilisé dans ce travail est Graph Pad. Prism. V 5.00.

4. Résultats et discussions

Dans cette partie, nous recherchons à tester l'effet antifongique et antimycotoxinogène des fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

4.1. Taux d'inhibition et détermination du CMI, CMF, CFS

Afin d'évaluer l'activité antifongique des deux fractions (ACT, BUT) des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill et mieux connaître la qualité et l'implication de ces fractions dans la réduction de la flore fongique productrice de l'AFB1.

Les résultats du screening obtenus avec les deux fractions ACT et BUT, dévoilent une inhibition importante de la croissance mycélienne de l'*Aspergillus flavus* à la concentration 2500 µg/ml.

Les taux d'inhibitions de l'*Aspergillus flavus* sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Taux d'inhibition de l'*Aspergillus flavus*

		Concentrations des fractions (µg/ml)					
		78	156	312	625	1250	2500
% d'inhibition	ACT	14 ±1.41	55±0.49	70.1±0.42	100	100	100
	BUT	16 ±0.01	72.1±0.14	100	100	100	100

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD

Il serait donc intéressant de déterminer les CMI, CMF, CFS car le taux d'inhibition des fractions testées sont très élevés.

Tableau 9. Concentration minimal inhibitrice (CMI), activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en µg/ml

	CMI (µg/ml)	CFS (µg/ml)	CMF (µg/ml)
ACT	625	625	-
BUT	312	312	-

D'après le tableau (8), les fractions perdent progressivement l'effet inhibiteur de la croissance contre *Aspergillus flavus* avec la diminution de sa concentration dans le milieu, autrement dit, pour la fraction ACT, au-dessous de la concentration 625 µg/ml, l'effet antifongique est réduit, et pour la fraction BUT au-dessous de la concentration 312 µg/ml, une croissance de la souche fongique a été remarquée.

Par ailleurs, les CMI obtenues varient en fonction des fractions, ils sont de l'ordre de 312 µg/ml pour la fraction BUT et 625 µg/ml pour l'ACT (tableau 9).

En effet, La fraction ACT a présenté, à la fois, une concentration minimale inhibitrice et une activité fongistatique sur *Aspergillus flavus* égale à 625 µg/ml. De même, la fraction BUT avait une CMI et CFS de l'ordre de 312 µg/ml

Toutefois, les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer uniquement une activité fongistatique (CFS) sur *Aspergillus flavus* et aucune activité fongicide n'a été remarquée avec toutes les fractions.

A notre connaissance, les informations relatives aux propriétés antifongiques des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill ne sont pas disponibles, par conséquent, il est difficile de comparer les résultats avec des travaux antérieurs. Et c'est récemment, Mocan *et al.*, (2017), étaient les premiers qui ont tenté de réaliser cette activité, par conséquent, la souche fongique testée (*Aspergillus flavus*) était résistante vis-à-vis de l'extrait de *Lycium* avec des CMI de 0,12 mg / ml.

Bien qu'il existe des rapports antérieurs sur la variation de l'activité antifongique des produits végétaux contre différentes espèces de champignon. Des études récentes ont démontré que les composés naturels extraits de différentes plantes médicinales traditionnelles (les espèces d'agrumes, huile essentielle de *C. axillaris* Roxb, l'huile essentielle de *C. virosa*) possèdent une activité antifongique remarquable (Prakash *et al.*, 2010 ; Durairandiyar et Ignacimuthu, 2011 ; Mishra *et al.*, 2012 ; Tian *et al.*, 2012). En outre, plusieurs études ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action des extraits de plantes et plusieurs chercheurs attribuent cette fonction aux composés phénoliques (Ultee *et al.*, 2002, Mishra, 2012). Ces composés peuvent interférer avec les biomembranes en causant des dommages cellulaires et provoquant la fuite de matériaux cellulaires et finalement la mort des microorganismes (Mshvildadze *et al.*, 2000; Abdel ghani *et al.*, 2008). C'est un mécanisme possible par lequel la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée par l'effet des extraits en agissant sur la

fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire (Sikkema *et al.*, 1995). L'avantage des extraits de plantes est donc leur bioactivité, une caractéristique qui les rend attrayants pour la protection des produits stockés tels que les grains d'arachide contre l'attaque des champignons et même le blocage de leur écotoxigénèse (Tripathi et Dubey, 2004). De plus les extraits polyphénoliques sont dotés d'un pouvoir antifongique plus que les huiles, cette forte activité des dérivés phénoliques serait liée à une bonne solubilisation de ceux-ci dans le milieu polaire du fait du groupement hydroxyle libre (Ben arafa *et al.*, 2006).

La souche fongique testée a réagi selon la nature et la concentration des fractions, autrement dit, l'activité biologique des fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill est probablement en relation avec sa composition chimique (composés phénoliques, saponines, terpènes, alcaloïdes ...), et les groupes fonctionnels tels que les groupements OH. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent également de manière synergique.

En combinant les résultats de cette étude avec la recherche bibliographique, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une relation étroite entre les composés phénoliques des fractions ACT et BUT tel que a.protocatechique, a.gallique, a. coumarique, a.syringique et la rutine avec leurs activités biologiques (antifongiques).

Des études récentes ont démontré l'activité antifongique des composés naturels extraits des plantes médicinales traditionnelles, entre autres, l'acide protocatechique qui a une activité anticancéreuse et antioxydante beaucoup plus élevée, ce composé est l'un des composants biologiquement actifs de certaines plantes médicinales, y compris celles utilisées en médecine naturelle comme Soudan Mallow (*Hibiscus sabdariffa*L) (Ali, 2005). Selon Oliveira et Didem, (2016), la rutine est considérée comme agent potentiel antifongique, et ce potentiel pourrait être dû à l'interférence de la synthèse des protéines microbiennes. Cependant, l'acide syringique avec d'autres acides phénoliques tel que l'acide gallique possèdent un effet antifongique, et peuvent jouer un rôle dans la limitation de la croissance des champignons (Chong, 2012 ; Mendoza *et al.*, 2013).

A la lumière de ces résultats, les fractions ACT et BUT investiguées ont eu un pouvoir antifongique plus marqué sur *Aspergillus flavus*.

4.2. Evaluation de l'activité antimycotoxinogène

4.2.1. Activité mycotoxinogénèse

La mise en évidence de l'activité mycotoxinogénèse de l'isolat purifié consiste à confirmer sa production de mycotoxines. De ce fait, l'*Aspergillus flavus* est mise en confrontation par contact direct avec des souches bactériennes, cette étude a été réalisée *in vitro* selon la méthode de diffusion sur gélose.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure (26)

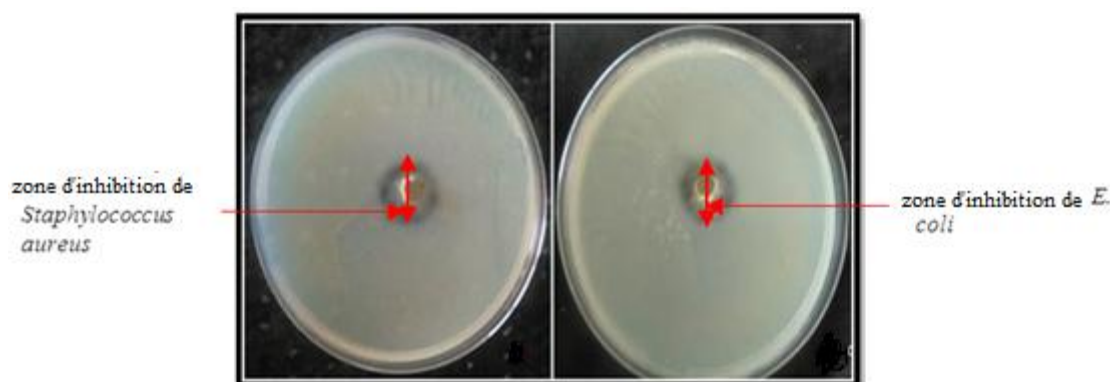


Figure 26. Test de mycotoxinogénèse

En effet, après 24 heures d'incubation, l'*Aspergillus flavus* a montré une activité inhibitrice positive vis-à-vis des souches bactériennes testées et ce, par l'apparition d'une zone d'inhibition due à un arrêt de croissance des deux bactéries en l'occurrence, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*.

Le test de mycotoxinogénèse a montré la présence d'une zone claire autour des disques contenant des colonies d'*Aspergillus flavus* estimée à 9 mm de diamètre dans le cas de *E. coli* et 10 mm dans le cas *Staphylococcus aureus* (figure 27). Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'*Aspergillus flavus* a synthétisé des métabolites secondaires (mycotoxines) diffusibles dans la gélose et capables d'inhiber la croissance de ces bactéries.

Plusieurs études ont mentionné que l'*A. flavus* produit plusieurs mycotoxines principalement des aflatoxines B1 et B2, et d'autres mycotoxines minoritaires comme l'acide kojique, l'acide aspergillique, l'acide cyclopiazonique, l'acide -nitropropionique, l'aspertoxine, l'aflatrème, la

maltoryzine et l'acide 3-nitropropionique (Gabal, 1994 ; Wagacha & Huwig *et al.*, 2001; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Coppock and Christian, 2007 ; Huffman *et al.*, 2010).

Et pour confirmer la production de mycotoxine ciblée en l'occurrence, l'aflatoxine B1, une fermentation liquide est développée dans le but d'extraire, de fractionner la toxine pour une étude chromatographique approfondie.

4.2.2- Production de l'Aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus* sur milieu submergé

Après 14 jours de fermentation en milieu YES à 25°C, une séparation de la biomasse a été effectuée par filtration, le filtrat a été utilisé pour l'extraction de l'aflatoxine B1 et la biomasse a été utilisée, après séchage, pour l'estimation du poids sec. En effet, ce dernier a été estimé à 4.6 ± 0.360 g/l (figure 27).



Figure 27. L'aspect de la biomasse d'*A. flavus* produite après fermentation sur milieu submergé

Selon la littérature, le milieu YES favorise le développement végétatif des *Aspergillus* et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production des mycotoxines, il est aussi adapté pour la production des quantités élevées d'aflatoxine (Davis *et al.*, 1966). Une autre étude de Gqaleni *et al.*, (1997) a montré que, sur milieu YES, à une aw de 0,9, *A. flavus* se développe dès 20°C, et la production d'aflatoxines se fait d'une manière meilleure à partir de 25°C.

Sur un autre volet, le filtrat a servi pour obtenir un aliquote de mycotoxine brute (AMB) qui a été soumise à une séparation chromatographique. L'utilisation de la chromatographie sur couche mince a révélé la présence, sous UV 365nm, de spots fluorescents bleu foncé (figure 28).

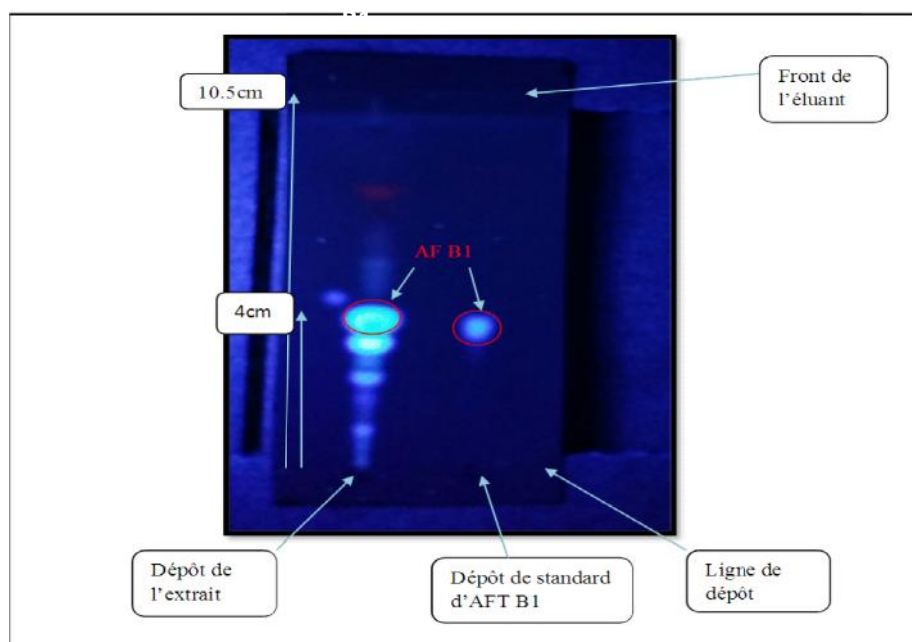


Figure 28. Chromatographie sur couche mince présentant les spots d'AFTB1 produite par *A. flavus* révélée sous lumière UV à 365nm.

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer l'aliquote de mycotoxine brute (AMB) en plusieurs spots apparus sous formes de spots colorées en bleu fluorescents après révélation sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm. Ces spots ont migré à différentes distances avec différents rapports frontaux. Après comparaison avec le spot obtenu par le standard d'aflatoxine B1 dont le R_f est estimé à 0,38, il a été constaté que la substance sparée a parcouru la même distance de migration ($R_f = 0,38$). Cette observation a permis de déduire que l'extrait (AMB) contient de l'AF B1, et par conséquent, l'isolat *Aspergillus flavus* produit effectivement de l'aflatoxine B1.

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire, très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires, sous lumière ultra-violette (UV longs), elles sont fluorescentes (bleue pour les AFB et verte pour les AFG, l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve) (Asao *et al.*, 1965 ; Abdellah, 2004 ; Toffa, 2015). Par ailleurs, plusieurs études ont été menées sur la contamination des arachides par les mycotoxines spécifiquement l'aflatoxine B1, due à la présence de l'*Aspergillus flavus* sur l'aliment (Xianwen *et al*, 2015; Fakruddin *et al*, 2015).

4.2.3. Analyse de l'aflatoxine B1 par HPLC-PDA

Pour confirmer la production de l'aflatoxine B1 par l'*Aspergillus flavus*, un fractionnement par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-PDA) a été réalisé.

Les analyses ont été effectués conjointement et sur le standards d'aflatoxine B1 et sur l'aliquote de mycotoxine brute (AMB). Le système solvant est composé d'eau et un modificateur organique l'acétonitrile (ACN), la phase mobile est souvent acidifiée par TFA. L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétention de l'aliquote de mycotoxine brute (AMB) avec ceux de standards d'AFB1 (pure à 99.99%) dans les mêmes conditions. Les profils chromatogrammes obtenus sont illustrés par la figure (29).

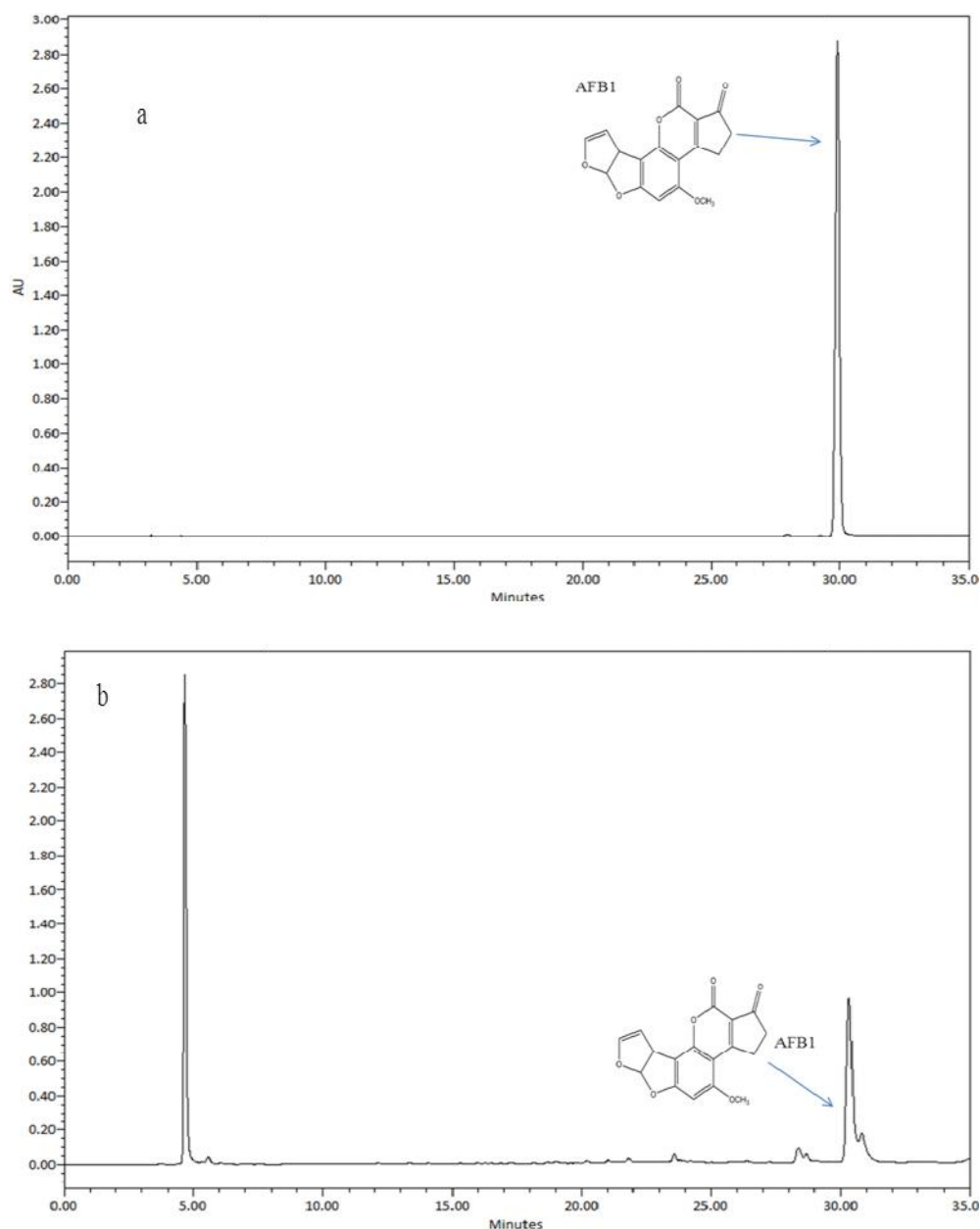


Figure 29. Profil HPLC de l'Aflatoxine B1 : (a) le standard d'aflatoxine B1, (b) l'aflatoxine B1 produite par l'isolat *A. flavus*

Le chromatogramme (b) de l'aliquote de mycotoxine brute (AMB), montre plusieurs pics avec un temps de rétention différent, cependant, il est remarqué l'existence de deux pics majoritaires qui représentent probablement AFB2 et AFB1.

Aussi, il ressort de cette expérience que le temps de rétention de l'aliquote de la mycotoxine brute (AMB) ($t_R = 30.13$ mn) correspond au temps de rétention du standard aflatoxine B1 ($t_R = 30.01$ mn (figure 30), ce qui permet de confirmer que le métabolite produit par l'isolat *Aspergillus flavus* correspond précisément à l'aflatoxine B1 standard.

La littérature consultée montre que, habituellement, l'*Aspergillus flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et B2 et il ne produit pas ni d'aflatoxine G1 ni G2 (Dorner et al, 1984 ; Castegnaro et PfohlLeszkowicz, 1999).

4.2.4. Activité antimycotoxinogénèse

Afin d'évaluer l'effet des deux fractions (ACT et BUT) des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill sélectionnées auparavant comme inhibiteurs de la synthèse de l'aflatoxine B1 par l'*Aspergillus flavus*, une fermentation a été réalisée dans le but d'évaluer l'influence de ces extraits sur la synthèse de la toxine, et par conséquent, la biomasse mycélienne a été estimée.

4.2.4.1. Détermination du poids de mycélium

Le poids mycélien et le pourcentage d'inhibition sont estimés, en comparaison avec le témoin et les valeurs obtenues sont montrées dans le tableau (10) :

Tableau 10. La biomasse et le pourcentage d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus flavus* traité par ACT et BUT

Fractions	Poids du mycélium (g/l)	% d'inhibition de la biomasse
ACT	2 ± 0.095	56.53 ± 2.74
BUT	1.6 ± 0.001	65.22 ± 0.10
Témoin	4.6 ± 0.360	-

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD

En effet, les résultats du tableau (10) montrent que la biomasse d'*Aspergillus flavus* traité par ACT et BUT est nettement inférieure par rapport à celle de la même souche développée dans le même milieu mais sans ACT et BUT. Il a été constaté que le pourcentage de réduction est de l'ordre de 56.53 ± 2.74% et de 65.22 ± 0.10% respectivement en présence de la fraction ACT et de la fraction BUT. Par conséquent, la souche *Aspergillus flavus* s'est révélée très sensible aux traitements. Ce résultat confirme ce qui a été obtenu sur milieu gélosé dans les tests préliminaires précédents.

Il est important de signaler que, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet, des extraits des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, sur la biomasse d'*Aspergillus flavus* en particulier lorsque ce dernier est ensemencé sur milieu submergé YES. De ce fait, ce travail peut être considéré comme étant le premier à s'intéresser à cet aspect.

Sur un autre volet mais dans la même optique, une étude a démontré que les extraits méthanoliques de feuilles d'autres plantes en l'occurrence *H. scoparium*, *A. schmittianun* et *D. Gnidium* ont inhibé la croissance mycélienne de l'*Aspergillus flavus* avec un pourcentage de 65,33%, 83,56% et 100% respectivement (Mohammedi et Atik, 2013). Cet effet inhibiteur peut être dû aux métabolites secondaire (flavonoïdes, huiles essentielles) des plantes (Dikbaset *al.*, 2008).

4.2.5. Evaluation de l'effet antimycotoxinogène par l'analyse chromatographique

Dans le but d'évaluer l'effet des fractions ACT et BUT sur la synthèse de l'aflatoxine B1, une chromatographie sur couche mince a été réalisée en présence des extraits de milieu de croissance de l'*Aspergillus flavus* supplémenté par ces fraction et non supplémenté (témoin). Les résultats obtenus sont révélés par la figure (30).

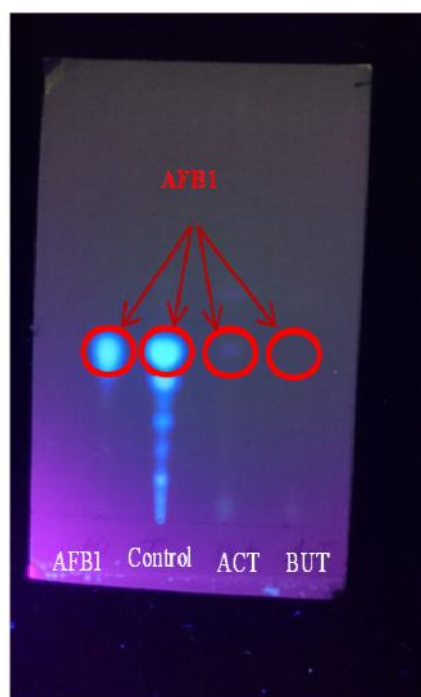


Figure 30. Estimation de l'aflatoxine B1 produite par l'isolat *A. flavus* par chromatographie sur couche mince (CCM), de gauche à droite : le standard AFB1, l'AFB1 issu de culture non supplémentée (contrôle), l'AFB1 issu des milieux supplémentés par les fractions ACT et BUT.

Le profil chromatographique, montre clairement l'absence presque totale des spots fluorescents révélant la concentration de l'AFB1 issu des milieux supplémentés par les

fractions ACT et BUT. Cette observation permet de déduire que les deux fractions ACT et BUT développaient la capacité d'inhiber la synthèse de l'aflatoxine B1 par l'*Aspergillus flavus*.

Pour confirmer ce résultat, une autre analyse pour le même objectif a été effectuée en utilisant, cette fois-ci, la chromatographie liquide à haute performance HPLC-PDA. Les résultats obtenus sont présentés par la figure (31).

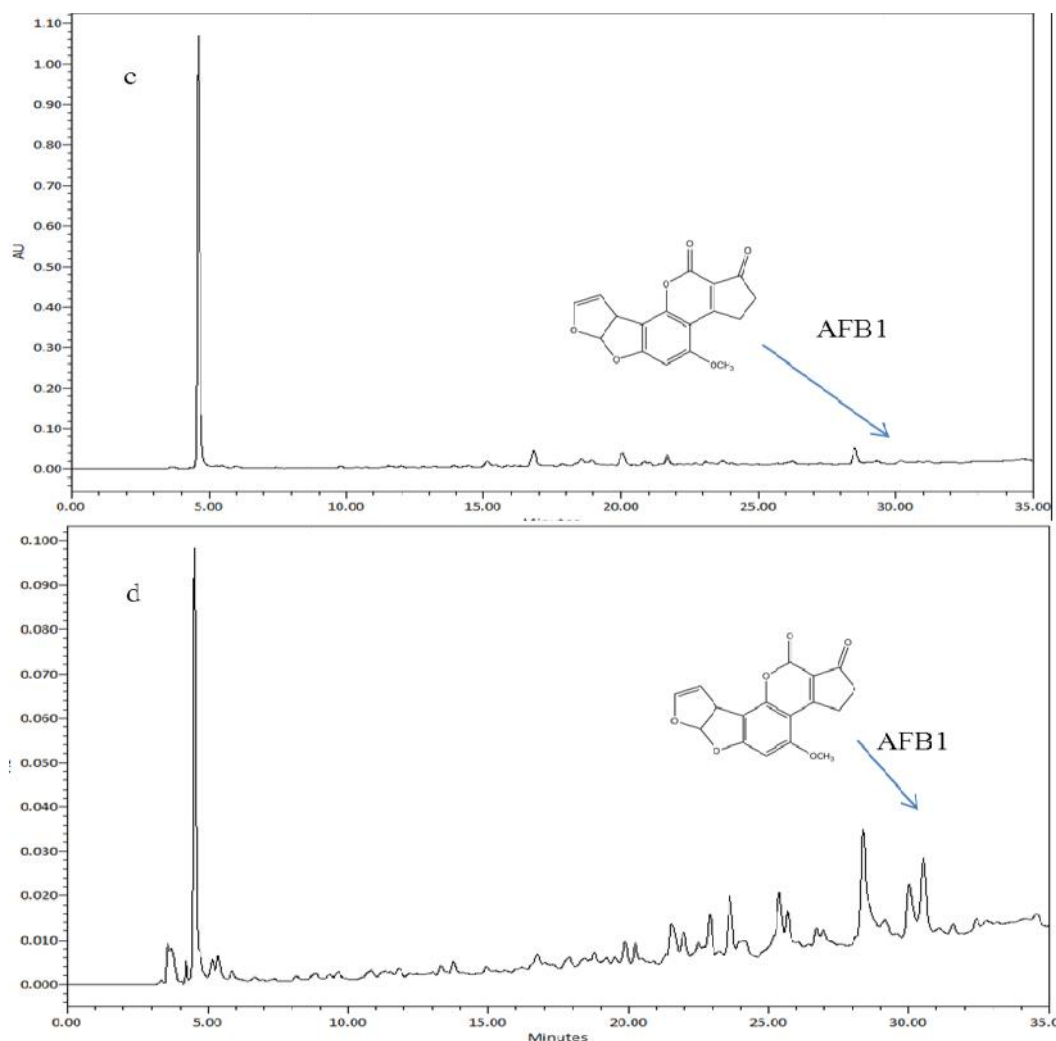


Figure 31. Estimation de l'aflatoxine B1 produite par l'isolat *A. flavus* par chromatographie liquide à haute performance HPLC-PDA : (c) l'AFB1 issu de milieu supplémenté par la fraction ACT, (d) l'AFB1 issu milieu supplémenté par la fraction BUT.

Le profil chromatographique (figure 31) montre une inhibition remarquable est presque totale de la synthèse de l'aflatoxine B1, lorsque le milieu de croissance contient les fractions ACT ou BUT.

Ainsi, le pourcentage d'inhibition de la sécrétion de l'aflatoxine B1 a été estimé à 96,83 % pour la fraction BUT (chromatogramme d) avec un temps de rétention égale à 30,09 mn, et un taux d'inhibition de l'ordre de 94,99% a été calculé pour la fraction ACT (chromatogramme a) avec $t_R = 30,18$ mn. Ces résultats ont été calculés, bien évidemment, en prenant en considération le profil du standard (figure 31).

En outre, les résultats ont clairement montré que l'inhibition de la sécrétion de l'aflatoxine B1 (96,83% pour la fraction BUT, et 94,99% pour la fraction ACT) est corrélée avec l'inhibition de la croissance mycélienne (pourcentage d'inhibition est de 65,22% et de 56,53% pour les fractions BUT et ACT consécutivement).

Il est important de signaler à nouveau que, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antimycotoxinogénèse des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, ce qui rend difficile, voire impossible de réaliser une étude comparative de ces résultats. En revanche, cela n'empêche pas d'expliquer l'effet inhibiteur de ces fractions.

Il est admissible d'expliquer ces résultats par le fait que les composants des extraits de feuilles sont majoritairement des polyphénols et ces derniers sont connus par leur activité antimicrobienne.

Plusieurs études ont montré la capacité des extraits de plantes à inhiber et la croissance et la synthèse de ses métabolites. Aussi, les travaux de Scalbert,(1991), et de Banso et Adeyemo, (2007) ont démontré que les polyphénols des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons. Bien avant, Hua *et al*, (1999) rapportent que les composés phénoliques inhibent au début plutôt qu'à la fin les étapes de la voie de biosynthèse de l'AFB1. Alors que Ghorbanian *et al*, (2008) rapportent que l'inhibition de la synthèse des aflatoxines est en relation avec le temps de contact et la dose de l'extrait. Récemment Neveen *et al.*, (2015) ont indiqué que l'huile essentielle d'*O. Basilicum* a une forte activité antifongique et inhibe complètement la croissance d'*Aspergillus flavus* (dans le même milieu de fermentation YES utilisé dans cette étude) avec un pourcentage de 70%, tandis que la production d'inhibition d'aflatoxine B1 a été observée à des concentrations 0.05, 0.075 and 0.1%. Compte tenu du grand nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les extraits de plantes (flavonoïdes, phénols, saponosides, tanins, alcaloïdes ...), il est intéressant de noter que l'activité antimicrobienne n'est pas attribuable à un seul mécanisme spécifique mais à plusieurs cibles dans la cellule. En effet, les extraits végétaux peuvent bloquer complètement la biosynthèse des mycotoxines où la croissance fongique n'est pas

affectée (Bhatnagar, 1988). Et d'après, Gacem, (2011) les extraits bruts des graines de *Citrullus colocynthis*, développent une activité antimycotoxinogène élevée par l'inhibition de voies de synthèses d'aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus* sans qu'ils affectent entièrement la croissance de cette dernière.

Classiquement, la rutine est utilisée comme agent antimicrobien et antifongique. Cependant, la recherche actuelle a montré ses avantages pharmacologiques pour le traitement de diverses maladies chroniques tels que le cancer, le diabète, l'hypertension et l'hypercholestérolémie (Sharma *et al.*, 2013). Son utilisation est avantageuse par rapport aux autres flavonoïdes car il s'agit d'une molécule non toxique et non oxydable (Sharma *et al.*, 2013). En outre il a été révélé par Chitarrini *et al.*, (2014) que la rutine semble être plus efficace pour inhiber la biosynthèse de l'aflatoxine par *Aspergillus flavus*. Une autre étude a montré que la rutine est un agent antifongique potentiel, et le potentiel antifongique de ce produit naturel pourrait être dû à l'interférence de la synthèse des protéines microbiennes (Oliveira et Didem, 2016).

Par ailleurs, l'acide protocatechique a été également signalé pour ses multiples actions potentielles telles que ; l'activité antioxydante, antimicrobienne, anticancéreuse, cardiaque et son effet hépatoprotectif (Kakkar, 2014). En outre, selon Jermnak *et al.*, (2012), l'acide gallique a inhibé la production d'aflatoxines chez *A. flavus*. Cependant, selon les mêmes auteurs, l'acide syringique n'a pas la capacité d'inhiber la production d'aflatoxines. D'après, Paster, (1988), l'acide -coumarique est capable d'inhiber totalement la croissance de l'*A. flavus* ainsi que la production d'aflatoxines. De même, la coumarine diminue la transformation de l'aflatoxine B1 à l'époxyde 8,9 et diminue ainsi leur toxicité (Douglas, 1998). Et selon Young-Sun, (2017), 38 composés de coumarines testés et la 4-hydroxy-7-méthyl-3-phénylcoumarine ont montré de puissantes activités antifongiques et antiaflatoxinogènes contre *A. flavus*, dont le mode inhibiteur de l'action antiaflatoxinogène était basé sur la régulation négative des facteurs de transcription aflD, aflK, aflQ et aflR dans la biosynthèse de l'aflatoxine.

Dans l'optique de ces résultats, les deux fractions ACT, BUT ont été jugées efficaces et capables d'inhiber la synthèse de l'aflatoxine B1 produit de l'*Aspergillus flavus*.

4.3. Autres activités biologiques

4.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions de *Lycium halimifolium*

L'activité antimicrobienne a été testée contre six bactéries pathogènes (*S. aureus*, *Bacillus sp Seratiasp*, *Acetobactersp*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) qui possèdent différentes propriétés de croissance. Les témoins négatifs testés (eau, DMSO) n'ont aucun effet sur les souches étudiées. Cependant toute action inhibitrice observée est donc due aux substances actives contenues dans les fractions testées.

Les résultats du test de diffusion sur disque sont mentionnés dans le tableau 11.

Tableau 11. Diamètres d'inhibition des différentes fractions vis-à-vis les germes testés

Fractions	Diamètres d'inhibition (Ø mm)					
	<i>E. coli</i> CIFA-25922	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC-27853	<i>S.aureus</i> ATCC-25923	<i>Bacillus</i> <i>sp</i>	<i>Seratias</i> <i>p</i>	<i>Acetobactersp</i>
ACT	-	-	-	-	-	-
BUT	16 ± 0.05	-	19 ± 0.02	-	-	-

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM

Selon la littérature, un extrait est considéré actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10mm (Tekwuet *al*, 2012)

Les résultats montrent que la fraction BUT avait une activité inhibitrice contre *E. Coli* égale à 16 ± 0.05mm et 19 ± 0.02mm contre *S. aureus*. Cependant, La fraction ACT était inactive vis-à-vis ces deux souches. En outre, les souches résistantes vis-à-vis les deux fractions étaient *Bacillus sp Seratiasp*, *Acetobactersp*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Jusqu'à nos jours, très peu de rapports concernant les propriétés inhibitrices bactériennes des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill ont été étudiés (Terauchi *et al*, 1998; Mocan, 2014).

Une étude comparative réalisée par Mocan *et al.*, (2014) sur l'effet antibactérien entre l'extrait éthanolique des feuilles de *Lycium halimifolium* M et de *Lycium chienens* (d'origine de Roumanie) a révélé que l'extrait de *Lycium chienens* a été plus actif que le *Lycium halimifolium* contre les bactéries Gram- et Gram+, dont le *Lycium halimifolium* a donné une zone d'inhibition de 12.3 ± 0.8 contre *E.coli* et 13.1 ± 0.9 contre *S aureus*. En revanche, les travaux antérieurs de Terauchi *et al.*, (1998), ont signalé que les bactéries Gram-positives et Gram- étaient sensibles au thé brassé à partir de feuilles de *Lycium chinense*.

Selon la dernière étude de Mocan *et al.*, (2017), *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* ont été les souches les plus sensibles vis-à-vis les extraits de *Lycium* avec des valeurs respectives de CMI et CMB similaires à 0,0019 mg / ml et 0,0038 mg / ml.

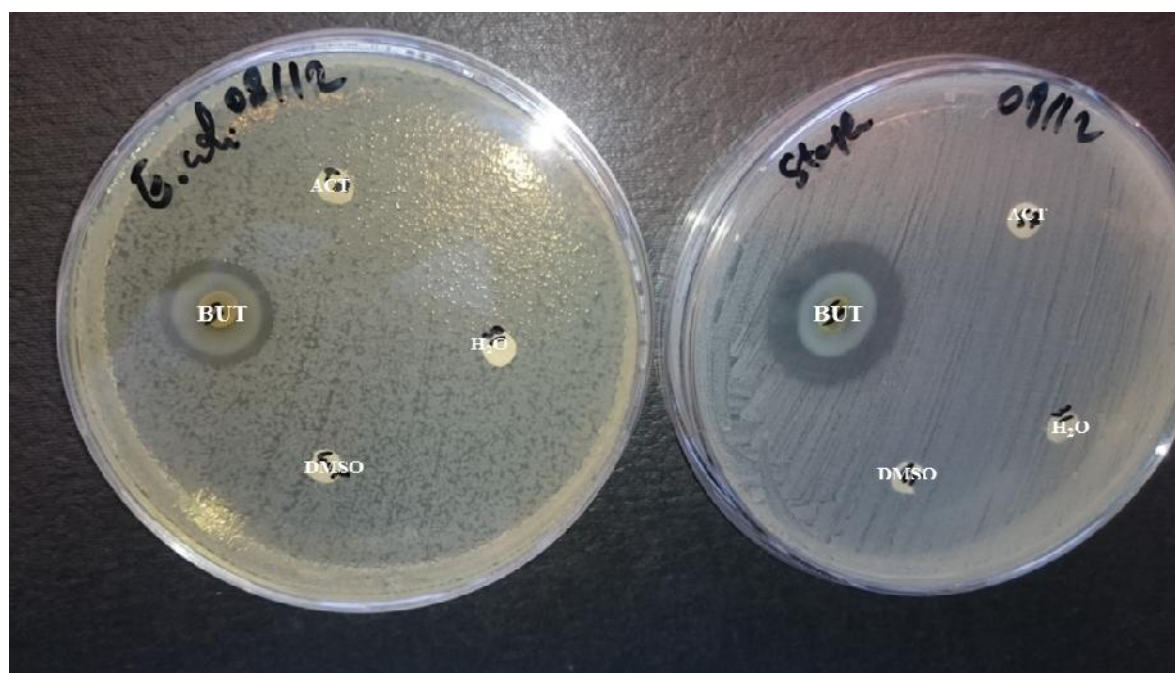


Figure 32. Zone d'inhibition de la fraction active relative aux souches sensibles.

Traditionnellement, les feuilles de *Lycium* sont utilisées dans le traitement des pathologies oculaires tel que la conjonctivite bactérienne dont l'agent pathogène est *staphylocoque*, cela justifie les usages ethnopharmacologiques de ces feuilles par les tradipraticiens comme un remède contre les maladies infectieuses de l'œil.

Nos résultats phytochimiques qualitatifs et quantitatifs des fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* M réalisés auparavant, ont prouvé la richesse de nos fractions par les acides phénoliques et flavonoïdes, et selon Chao et Yin, (2009), Liu *et al.*, (2005), l'acide protocatechuique peut être utilisé dans les aliments afin d'éviter la contamination par le *campylobacter*, et inhibe également la Croissance de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

D'après l'étude de Aziz, (1998), les acides caféiques et protocatechuiques (0,3 mg / ml), l'acide syringique (0,5 mg / ml) et p-coumarique (0,4 mg / ml) ont complètement inhibé la croissance de *E. coli*.

En outre, selon Marjorie, (1999), les flavonoïdes peuvent former des complexes avec des protéines solubles et des parois cellulaires des bactéries, et les saponines réagissent également et exercent un effet antibactérien qui peut être attribué à sa capacité à provoquer une fuite de protéines ainsi que certains enzymes de la cellule.

Les différences de sensibilité des bactéries à Gram négatif et des bactéries Gram positif indiquées par la présence des substances antimicrobiennes. En effet les bactéries Gram positif ont une couche externe plus perméable riche aux peptidoglycane alors que les bactéries à Gram-négatif ont une barrière extérieure plus rigide phospholipides (Grevenstuk *et al.*, 2009).

Les résultats suggèrent que les composés de nos fractions endommageant la fonction de la paroi cellulaire des bactéries à Gram+ et à Gram-.

En conclusion, l'effet de la fraction BUT était le meilleur sur les deux souches testées. Ce résultat ouvre des perspectives pour développer le mécanisme moléculaire de l'inhibition bactérien, et cibler les molécules responsables de cet effet.

4.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante

4.3.2.1. Effet capteur du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH)

En faisant varier les concentrations des fractions et on calculant pour chaque concentration, le pourcentage d'inhibition (I%) correspondant. Et c'est à partir de ces profils que nous avons déduit la valeur correspondante à la IC₅₀ (figure 33).

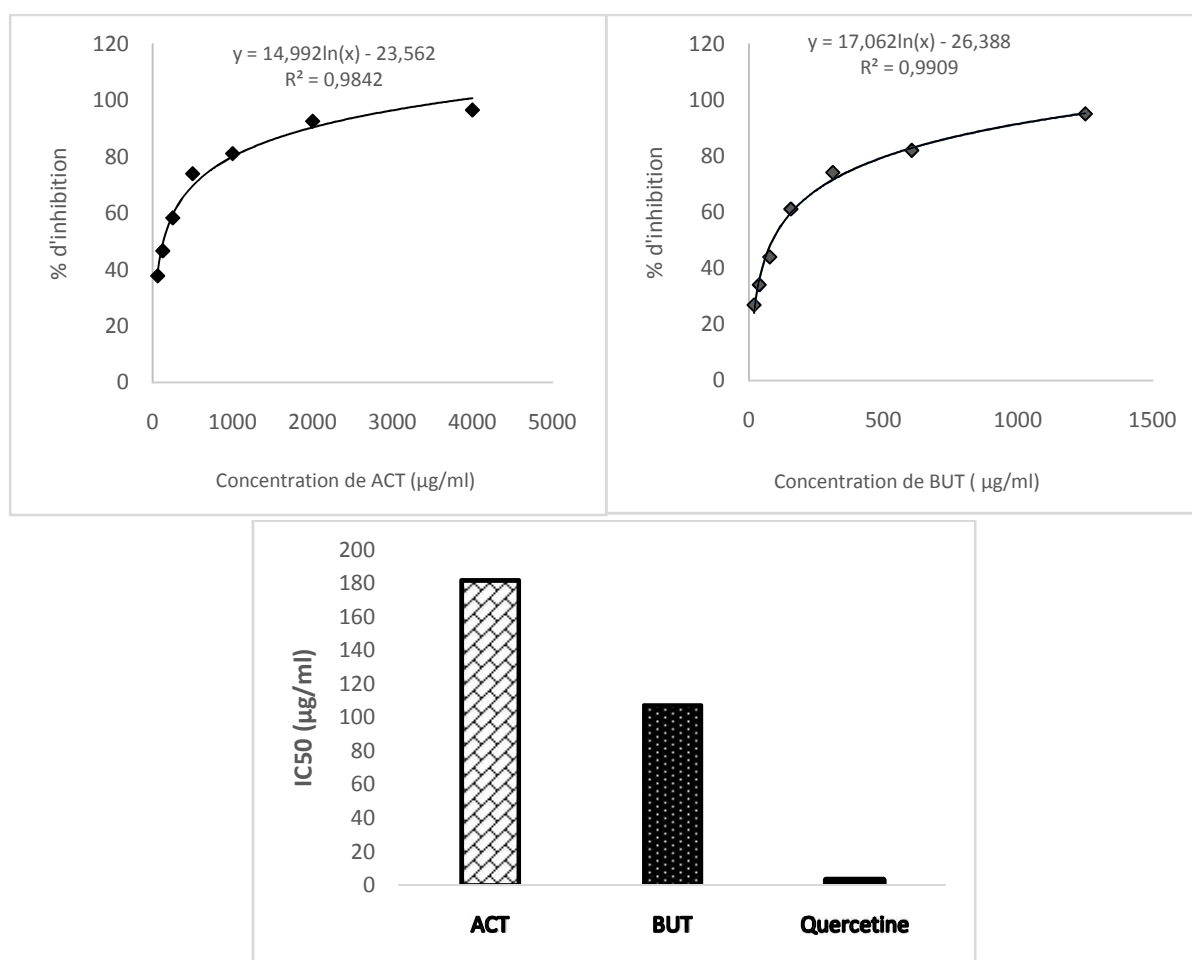


Figure 33. Activité antiradicalaire des fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* M et de la quercétine

Tableau 12. Les IC₅₀ des fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* M et de la quercétine.

Echantillons	IC ₅₀ (µg /ml)
ACT	181.8 ± 0.81
BUT	107.5 ± 1.41
Quercetine	3.24 ± 0.11

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM

D'après le support graphique (figure 33), la fraction BUT atteint un pourcentage d'inhibition 95.27 ± 0.01 % à une concentration de 1250 $\mu\text{g/ml}$, alors que, la fraction ACT atteint 83.34 ± 0.14 % à la même concentration.

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les fractions testées possèdent une activité dose-dépendante. En outre, la présence d'une phase stationnaire signifie une réduction presque totale du radical DPPH^\bullet en sa forme non radical DPPH-H.

Les résultats indiqués dans le tableau (12) représentent les concentrations des différentes fractions qui piègent 50% du radical DPPH (IC₅₀). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Nous rappelons que plus cette concentration (IC₅₀) est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Tsimogiannis et Oreopoulou, 2004; Atoui *et al.*, 2005).

Le tableau (12) montre que la fraction BUT est la plus active avec une IC₅₀ = 107.5 ± 1.41 $\mu\text{g/ml}$, et possède une activité anti-radicalaire supérieure à la fraction ACT ayant une IC₅₀ de l'ordre de 181.8 ± 0.81 $\mu\text{g/ml}$, et inférieure à celle de la quercétine qui a un IC₅₀ = 3.24 ± 0.11 $\mu\text{g/ml}$. Cette activité antiradicalaire est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques des fractions. Ceci est expliqué par le fait qu'en présence d'un radical libre DPPH^\bullet , l'atome H de l'antioxydant est transféré sur ce radical alors transformé en une molécule stable DPPH-H, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre ainsi que l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

Cependant, ces résultats sont différents aux travaux réalisés par Boulila *et al.*, (2015) qui a trouvé que l'extrait brut méthanolique des feuilles de *Lycium intricatum* possède un IC₅₀ = 51.31 ± 4.86 $\mu\text{g/ml}$.

Cette Activité antiradicalaire de ces fractions, est peut être due aux acides phénoliques et flavonoïdes trouvés dans les fractions ACT et BUT à savoir : l'acide protocatéchique (composé majoritaire), acide gallique, acide syringique, acide p-coumarique et la rutine.

D'après Li *et al.*, (2011), l'acide protocatéchique est considéré comme un élément actif de certaines plantes médicinales chinoises traditionnelles, leurs activités antioxydantes ont été mesurées *in vitro* en utilisant divers essais antioxydants dont le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH •), 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique (O2- •) et l'activité de balayage des radicaux hydroxylés (OH), des ions ferriques (Fe³⁺) et d'autres. Par conséquent, il a montré une activité antioxydante très intéressante, et possédant divers effets pharmacologiques qui peuvent être étroitement corrélés avec ses activités antioxydantes,

comme il pourrait être utilisé dans l'industrie pharmaceutique ou alimentaire comme un antioxydant naturel.

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des fractions qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres. Liao et Yin, (2000) ont démontré que les combinaisons d'acide alpha-tocophérol et/ou ascorbique avec l'acide caféique, la catéchine, l'épicatéchine, la myricétine, l'acide gallique, la quercétine et la rutine ont une activité antioxydante plus élevée que chacun de ces composés pris isolément pour l'oxydation des lipides. De ce fait, la présence de l'acide syringique même à faible concentration (0,142-0,236%) avec l'acide gallique dans les fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* M peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH.

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend également de la conformation structurale de l'antioxydant (Kouri *et al.*, 2007). Quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de DPPH égale à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997). La configuration spatiale et le nombre de groupement OH des structures flavonoïdiques peuvent avoir une influence sur les différents mécanismes antioxydants (Hein *et al.*, 2002).

Chapitre IV
Etude de l'effet
antihépatotoxique

1. Introduction

Depuis plusieurs années, les cancérologues pensent que des facteurs alimentaires sont impliqués dans l'étiologie de certains cancers. De nombreuses données épidémiologiques ont montré des associations fréquentes entre la consommation de certains aliments et l'incidence de certains cancers à titre d'exemple, le cancer du foie et la contamination en aflatoxine B1, qui a été classé en 2002, dans le groupe 1 de cancérigène par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) (Tozlovanu, 2008).

En effet, l'intoxication par l'aflatoxine B1 peut provoquer de graves dégâts à savoir des lésions du foie, des congestions, des hémorragies, d'œdèmes voire même de carcinome hépatocellulaire, pouvant entraîner la mort de l'animal et l'être humain (Gita, 2005).

Le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments, ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié à la thérapie. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la protection d'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter un effet contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, serait dus aux microconstituants de cette diète dont les polyphénols sont les principaux représentants (Torreggiani, 2005).

Pour le besoin de la présente étude, nous avons choisi les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill. Ses extraits sont traditionnellement utilisés dans le traitement de la conjonctivite, la cataracte, le cancer, les maladies hépatiques et d'autres. Le choix de cette plante est justifié par son rare emploi dans notre pays à cause de l'ignorance de sa valeur nutritionnelle et médicale.

Notre étude consiste à évaluer *in vivo* l'effet préventif et/ou thérapeutique des fractions de feuilles de *Lycium halimifolium* Mill vis-à-vis de la toxicité hépatique de l'aflatoxine B1.

2. Synthèse bibliographique

2.1. Anatomie du foie

Le foie est un organe abdominal des vertébrés impliqué dans plus de 300 fonctions vitales, notamment les fonctions suivantes : une fonction nutritionnelle (métabolisme des glucides et les lipides...), une fonction de synthèse (synthétise des protéines, la bile), une fonction sanguine (facteurs de coagulation...), une fonction antitoxique (destruction des toxines...) et une fonction de stockage (vitamines, Fe...). Il aide aussi au métabolisme et est hautement vascularisé(Desmeules *et al.*, 1999; Plaa et Charbonneau, 2001).

Le foie est de couleur rouge-brun, homogène. Sa surface, recouverte en grande partie de péritoine et d'une capsule fibreuse, est lisse, c'est le plus gros organe solide du corps, avec un poids représentant environ 2% du poids du corps humain. Le foie est divisé en huit segments fonctionnels indépendamment, chaque segment a son propre pédicule portal, composé d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche portal, d'une voie biliaire et une branche veineuse hépatique distincte (figure 34) (Soler *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2004).

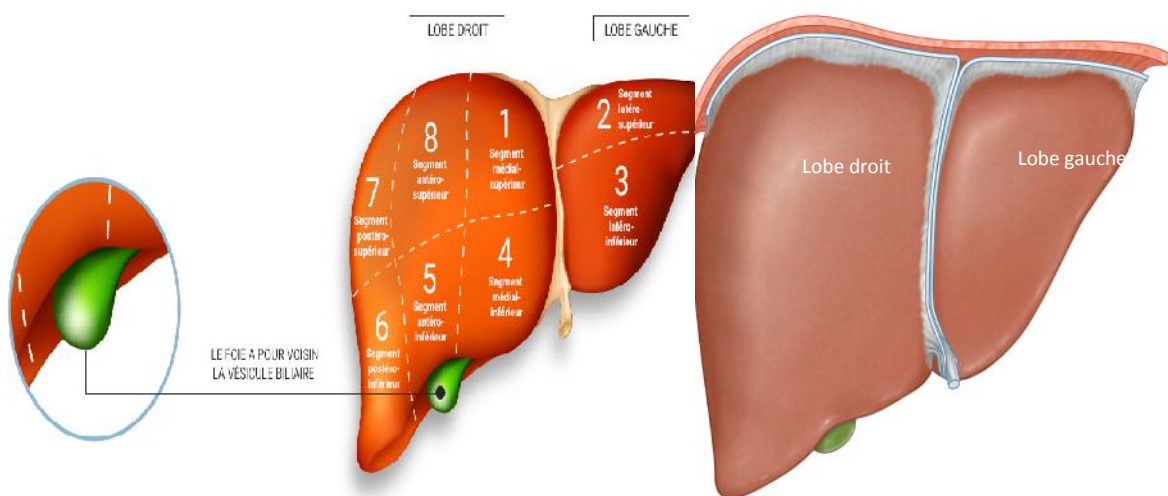


Figure 34. Anatomie segmentaire du foie.

Dans une coupe histologique d'un fragment de foie, on reconnaît des unités parenchymateuses hexagonales, ou « lobules » ; les cellules parenchymateuses, les hépatocytes, sont disposées en travées, ou plutôt en lames (figure 35), qui convergent vers le centre du lobule. À la périphérie, on trouve les espaces portes, dont chacun contient une triade portale : un petit canal biliaire, une artériole, branche de l'artère hépatique, et une veinule, branche de la veine porte (Hecht, 1991).

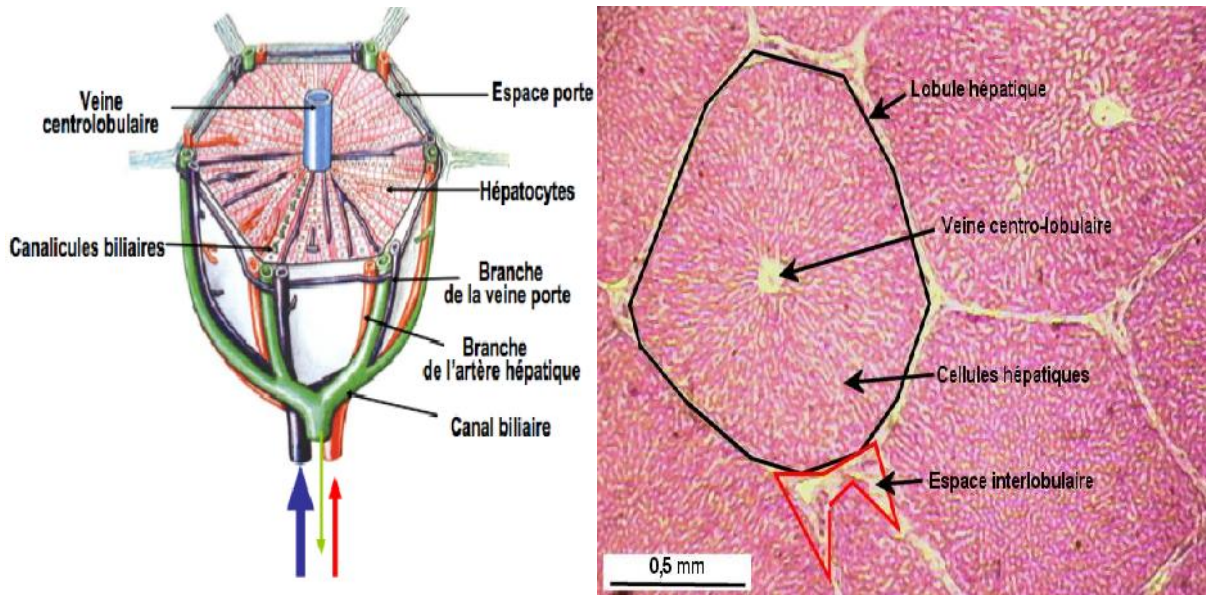


Figure35. L'organisation du foie (Marie, 2012).

2.2. Toxicité de l' aflatoxine B1

L'AFB1 est classée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer dans le groupe 1 comme un cancérigène potentiel chez l'homme et les animaux, surtout le carcinome hépatocellulaire est considérée comme puissante mutagène qui a causé les dommages des cellules (IARC, 2002).

2.2.1. La toxicité aiguë d'AFB1

Elle est corrélée par la production de l'AFB1-8,9 dihydrodiol. En effet, l'AFB1-8,9-époxyde est transformée en 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-AFB1 (AFB1-8,9-dihydrodiol) soit spontanément soit par l'action de l'époxyde hydrolase (Johnson *et al.*, 1997 ; Kibge, 2015).Ce dernier se lie aux protéines et conduit à la formation d'un adduit majeur (Wild *et al.*, 1990 ; Sabbioni et Wild, 1991).

La toxicité aiguë se caractérise par la dose létale DL50 qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée. Concernant les aflatoxines, ce type de toxicité est moins fréquent chez l'homme que chez les animaux. Chez le caneton, les souris et les êtres humains, la DL50 des AFB1, est respectivement de l'ordre de 0,36 ; 9,0 ; 5,0 mg/kg (Hussein et Brasel, 2001 ; Moss, 2002).

2.2.2. Toxicité chronique d'AFB1

La toxicité chronique des aflatoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles. Ce type de toxicité peut apparaître aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Des études

épidémiologiques menées dans le Sud-est asiatique et en Afrique ont démontré que les cancers hépatiques sont beaucoup plus fréquents chez certains groupes de la population humaine dont le régime alimentaire est élevé en aflatoxines. D'après Hussein et Brasel, (2001), plus de 250 milles décès annuels sont recensés en Chine et en Afrique subsaharienne et qui sont causés par des carcinomes hépatocellulaires attribués aux facteurs de risques comme l'ingestion journalière élevée en aflatoxines qui atteint 1,4 µg/kg et l'incidence du virus de l'hépatite B (VHB). Selon Herrman et Walker, (1999), la virulence des aflatoxines chez des individus porteurs du VHB est nettement plus élevée que chez ceux qui ne le sont pas. L'AFB1 et le VHB peuvent agir en synergie, l'infection par le VHB induit les enzymes activatrices de l'aflatoxine en augmentant son pouvoir cancérogène potentiel (Chen *et al.*, 2001)

Et donc, la toxicité de l'aflatoxine BI est liée aux effets biochimiques résultant de l'interaction de son dérivé époxy et les cellules hépatiques. Les différentes perturbations métaboliques observées sont principalement l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ARN, ADN et mitochondriales) et des protéines avec la disparition du contrôle en retour de la synthèse du cholestérol considérée comme une caractéristique de l'état précancéreux (FAO, 1979 ; Wray, 1982). En outre, la dégranulation précoce du réticulum endoplasmique du réticulum de l'hépatocyte, l'augmentation de la perméabilité cellulaire et l'interruption du transfert d'électrons au niveau des mitochondries, responsable de la forte baisse de la respiration cellulaire et la perméabilité accrue des membranes lysosomiales conduisant à une fuite des hydrolases acides non liées, ont été également observé dans le cas de l'intoxication par l'aflatoxine BI (Patterson, 1976). Ainsi la nécrose hépatocellulaire aiguë semble résulter de l'interaction des aflatoxines en divers sites intracellulaires alors que la mutagénicité et la cancérogénicité de ces toxines sont subordonnées probablement à l'action métabolique d'un agent alkylant l'ADN, l'époxyde 2-3 (Carlborg, 1979).

2.3. Aflatoxicose et le cancer du foie

Les cancers résultent de la prolifération anarchique de certaines cellules de l'organisme dont le cycle cellulaire est dérégulé. Plus de 50% des cas, le gène p53 codant pour la protéine nommée p53 est muté et est donc impliqué dans la cancérisation. Dans les tissus sains, la protéine p53 activée se lie directement à l'ADN, induisant un arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, permettant les réparations d'éventuels dommages de l'ADN altéré.

Dans le tissu cancéreux (exp : hépatocarcinome), le gène p53 est altéré en position du codon 249, la protéine ne se lie plus à l'ADN, la cellule n'est plus bloquée en interphase, les altérations de l'ADN ne sont plus réparées, l'instabilité génétique de la cellule augmente et la cellule prolifère : la cellule devient une cellule maligne (Hall, 1997 ; Thierry, 2000 ; Hélène, 2013).

Dans le cas de l'aflatoxicose, l'histopathologie pratiquée sur des prélèvements de foie ont révélé une prolifération intense du canal cholédoque, un œdème, des infiltrations graisseuses des lésions hépatiques et la nécrose du foie (Krishnamachari *et al.*, 1975 ; Bhat et Krishnamachari, 1977).

Par ailleurs, La relation entre l'exposition à l'aflatoxine B1 et le développement du l'hépatocarcinome (HCC) a également été mise en évidence dans les études de biologie moléculaire. En effet, la littérature scientifique montre que de nombreux l'hépatocarcinome(HCC) correspond à une mutation somatique (transversion G:CT:A) qui n'affecte que les cellules hépatiques. De même, des études sur les mutations de p53 dans les HCC survenant dans les populations exposées par leur alimentation à des niveaux élevés d'aflatoxine excrétés par *Aspergillus flavus* dont les fréquences de transversion G T sont élevées au niveau de la troisième base du codon 249 de p53 (Bressac *et al.*, 1991 ; Hsu et coll., 1991 ; Greenblatt *et al.*, 1994).

Par conséquent, l'AFB1 est classée dans le groupe 1 par l'IARC, car elle peut induire l'apparition d'hépatocarcinome (IARC, 2002). En effet, l'AFB1 peut subir une oxydation sur sa double liaison 8,9 en formant l'AFB1- 8,9 époxyde hautement toxique. Ce composé, instable et électrophile, peut interagir avec des composés contenant des sites nucléophiles, comme les acides nucléiques, les protéines (protéines nucléaires, liaison aux histones H3) en formant des adduits (AFB1-N7-guanine). Ces adduits modifient la structure et les fonctions des grosses molécules, comme l'altération du transport des électrons et de la respiration cellulaire (cytochromes b et c), l'inhibition de la transcription et de la réplication des cellules, l'altération du métabolisme lipidique ou une action choléstatique et le stress oxydatif (McLean and Dutton, 1995).

2.4. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les oxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Pincemait *et al.*, 2000 ; Sorg, 2004). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou

même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, toxine tel que l'aflatoxine B1, médicaments...) (Pincemilet *al.*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

Pour se protéger des effets toxiques des produits oxydants, l'organisme développe des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes, de vitamines et de protéines et d'autres sont directement apportés par les aliments : vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols, en empêchant les radicaux libres d'atteindre leurs cibles et de les endommager (Pincemilet *al.*, 2002).

2.5. Les antioxydants

Au sens large, un antioxydant est un composé qui inhibe ou retarde l'oxydation des substrats, même si le composé est présent en concentration plus faible de façon significative que le substrat oxydé. Les composés antioxydants peuvent être recyclés dans la cellule ou bien ils sont irréversiblement endommagés, mais leurs produits d'oxydation sont moins nuisibles, pouvant être convertis en substances inoffensives (Halliwell et Gutteridge 1995, 2007 ; Matkowski, 2008).

2.5.1. Systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes qui ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du O_2^- et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire.

2.5.2. *Le superoxyde dismutase*

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

2.5.3. *La catalase*

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

2.5.4. Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).

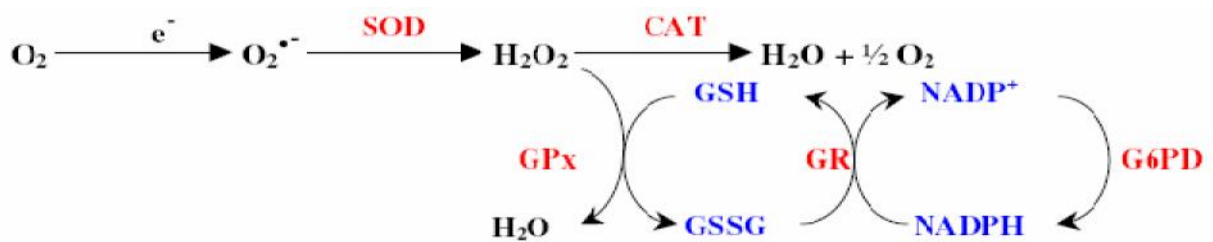


Figure 36. Le cycle d'oxydoréduction du glutathion.

2.5.5. Systèmes non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

3. Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée au sein de l'animalerie de l'Université des frères Mentouri, Constantine, Algérie, en collaboration avec le laboratoire d'anapathologie et d'hématologie du Centre Hôpitalo-Universitaire « CHU » de Constantine.

3.1. Etude de l'effet antihépatotoxique des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill

L'évaluation de l'impact protecteur probable des fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill vis-à-vis de la toxicité de l'AFB1, consiste à utiliser des souris comme un modèle expérimental.

3.1.1. Choix et préparation des animaux

L'étude expérimentale a porté sur des souris mâles de type *Swiss albinos* en croissance ayant un poids moyen initial de 20 - 25 g, fournis par l'animalerie du Département de Biologie Animale de l'Université des frères Mentouri, Constantine, Algérie. Dès leur réception, les souris sont placées aléatoirement dans des cages en polyéthylène et tapissées d'une litière composée de copeaux de bois pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisées dans les différentes expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à l'eau, alimentation composée de l'orge, maïs, remoulage, soja et CMV (Complexe Minéro-Vitaminique) est fournies par le même département, et sont maintenus dans une animalerie à température constante (23 ± 2) °C soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/24h.

3.1.2. Traitement des animaux et données expérimentales

Les poids des souris ainsi que la quantité d'aliment ingéré sont pris quotidiennement. Une hépatotoxicité expérimentale est induite par l'administration *per os* de l'aflatoxine B1 à raison de 0.7mg/kg du poids corporel des souris, dissous dans du NaCl à 0,9 %. Pour la détermination de l'effet protecteur des extraits, le protocole expérimental utilisé est celui décrit par Deabes *et al.*, (2012). Aussi, les souris sont réparties en quatre lots expérimentaux à raison de 10 souris par lot:

Lot 1 : Représente des souris sans traitement qui a servi de témoin.

Lot 2 : Représente le lot traité par Aflatoxine B1 (0.7 mg/kg de poids corporel).

Lot 3 : Représente le lot traité par l'ACT (500 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le gavage de l'aflatoxine B1 (0.7 mg/kg de poids corporel).

Lots 4 : Représente le lot traité par le BUT (500 mg/kg de poids corporel) 2 heures avant le gavage de l'aflatoxine B1 (0.7 mg/kg de poids corporel).

3.1.3. Prélèvement sanguin

La nuit du 7^{ème} jour, tous les animaux sont mis à jeûne, le lendemain (8^{ème} jour), le prélèvement du sang a été effectué à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite, à travers le sinus rétro-orbital au niveau de la veine orbitale des souris, préalablement, anesthésiés par du chloroforme. Des échantillons du sang, d'environ 1ml, ont été recueillis dans des tubes contenant l'héparine destinés pour les analyses biochimiques hépatique (ASAT, ALAT et PAL). Les tubes ont été centrifugés à 3000tr/10min et le sérum obtenu est conservé à une température de -15 à -20°C jusqu'à son utilisation (Ben-Romdhane *et al.*, 2003)

3.1.4. Sacrifice des animaux

À la fin de la période du traitement (8^{ème} jour), et après le prélèvement sanguin, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, et le foie a été prélevé. Les foies sont immédiatement rincés avec de l'eau physiologique, séchés avec du papier filtre puis pesés, chaque foie est partagé en deux parties ; l'une a été utilisée pour le dosage des paramètres du stress oxydatif et l'autre partie a été fixée dans le formol pour utilisation ultérieure.

3.1.5. Dosage des marqueurs de l'hépatotoxicité

Les analyses biochimiques hépatiques ont été réalisées au niveau du Laboratoire Centrale de l'Hôpital Universitaire de Constantine à l'aide d'un appareil automatique de type TECHNICON, RA-1000. Le bilan hépatique effectué consiste à doser dans le sérum des principaux marqueurs moléculaires de lésions hépatiques, qui sont les transaminases, ASAT (Aspartate Amino Transférase ou Glutamate Oxaloacétique Transaminase, TGO, qui ont une distribution beaucoup plus large, dans le foie, le cœur, les muscles squelettiques, les reins, leur dosage sanguin estime la partie cytoplasmique de cette enzyme, soit environ 10% du total (Imbert *et al.*, 2003). ALAT (Alanine Amino Transférase ou Glutamate Pyruvate

Transaminase, TGP) qui est présente essentiellement dans les hépatocytes, le cytoplasme, et accessoirement dans les muscles et le rein. Egalement, le dosage des phosphatases alcalines (PAL) qui est le marqueur habituel de cholestase, et son élévation dans sang est l'un des signes des atteintes hépatiques cholestatiques (Gopalet *al.*, 2000).

3.1.6. Dosage des paramètres du stress oxydatif

3.1.6.1. Préparation de cytosol des hépatocytes

Une gamme de tissus hépatiques sont homogénéisés avec 5 volumes de tampon phosphate (0,1 M ; pH : 7,4) contenant du KCl : 1,15 %. Après centrifugation à 10 000 rpm pendant 45 minutes à 4 °C, le surnageant est récupéré et utilisé comme source de la catalase (CAT) (Sanmugapriya et Venkataraman, 2006).

3.1.6.2. Évaluation de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité catalasique est déterminée par la méthode de Clairborne, (1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H₂O₂ en présence de la source enzymatique à 25 C° selon la réaction suivante :



Pour ce faire, un mélange réactionnel est constitué de 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄:0,1 M, pH : 7,2), 0,975 ml de H₂O₂ fraîchement préparé (0,019 M) et 0,025 ml de cytosol (source d'enzyme) sont additionnés. L'absorbance est lue à 240 nm chaque minute pendant deux minutes, et l'activité enzymatique est calculée en termes d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéine) selon la formule suivante :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A1/A2) / \text{g de protéine.}$$

A1: Absorbance à la première minute.

A2: Absorbance à la deuxième minute.

T: Intervalle de temps en minute.

Les protéines totales dans l'homogénat du foie sont déterminées selon la méthode de Biuret en utilisant le Kit (Spinreact BSIS30-1). Le principe de ce test est basé sur la complexation

entre les protéines et les sels de cuivre pour donner un complexe violet-bleu intense en milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon et déterminée par mesure de l'absorbance à 540 nm contre une courbe d'étalonnage (Koller, 1984).

3.1.6.3. Évaluation de la peroxydation lipidique

Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 530 nm). Le principe de cette méthode est résumé dans la figure (37).

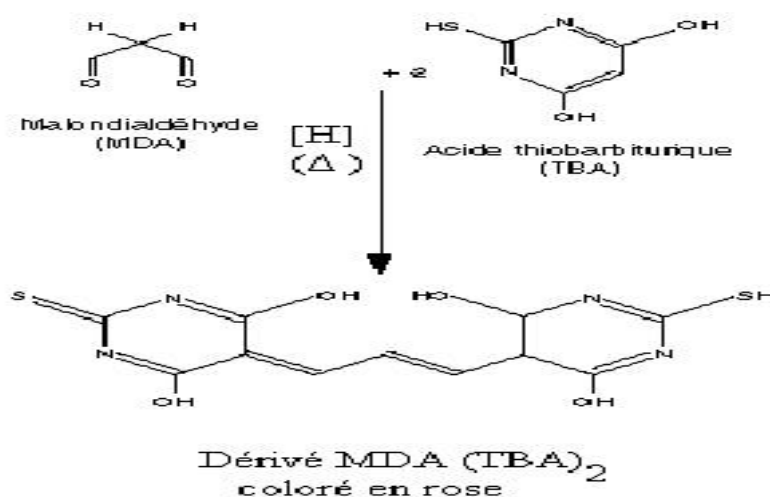


Figure 37. Principe du dosage du malondialdéhyde

La peroxydation lipidique dans le foie est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA). Un gramme de foie est additionné à 5 ml de solution de KCl (1,15 %) puis homogénéisé. À 0,5 ml de l'homogénat, 3 ml d'acide phosphorique (1 %) et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA : 0,67 %) sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 45 minutes, refroidi ensuite additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/min, l'absorbance est déterminée sur le surnageant à 532 nm. Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/g de foie (Uchiyama et Mihara, 1978; Jurina-Romet., 1996)

3.1.6.4. Dosage de glutathion hépatique (GSH)

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman, (1959). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'-Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm, selon la réaction suivante (figure 38)

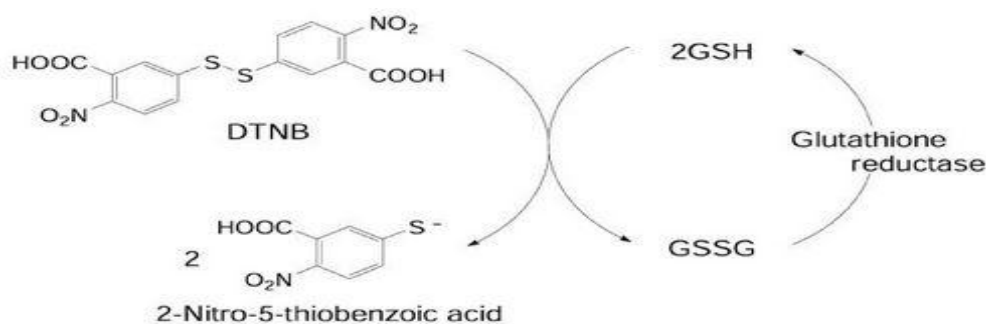


Figure 38.Principe de dosage du glutathion

L'acide 5,5`dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) est réduit par le glutathion (GSH) pour produire un composé jaune. Pour ce dosage, 50 µl d'homogénat du foie sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 8). Ensuite, 3 ml de la solution d'homogénat diluée sont mélangés avec 20 µl de DTNB (0,01 M). La lecture de la densité optique est effectuée après 5 min d'incubation, à température ambiante, à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10%. Les concentrations sont exprimées en nmol/g de foie.

3.1.7. Etude histologique

3.1.7.1. Préparation des blocs

La réalisation des coupes histologiques a été effectuée au niveau du laboratoire central d'anatomie pathologique à l'Hôpital Universitaire de Constantine. Après avoir fixés le foie dans du formol (10%) pendant une semaine,des fragments ont été déshydratés par submersion dans des bains d'éthanol à des concentrations allant en ordre croissant : 60 %, 70% ,80%, et 100%. Après déshydratation, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondues. Le xylène occupe la place de l'eau et donc facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. La durée de chaque bain est de 24 heures (l'opération est automatisée à l'aided'un automate). Les

échantillons des foies sont placés dans des moules recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe.

3.1.7.2. Réalisation des coupes et coloration

les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 3µm d'épaisseur. A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine qui sont ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure.

Pour mettre en évidence les hépatocytes, les coupes sont d'abord réhydratées par submersion successivement dans les bains suivants : 2 bains de toluène (30 min), 5 bains d'éthanol à des concentrations décroissantes : 100%, 90%, 80%, 70%, 60% (5 min chacun). Après rinçage dans de l'eau distillée, les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline (8 min) pour colorer les noyaux, l'excès de colorant est enlevé par l'acide chlorhydrique. Elles sont mises ensuite dans un bain d'éosine (8 min) pour colorer le cytoplasme, l'excès de colorant est enlevé par l'éthanol. Pour éviter les interférences de couleurs, une deuxième coloration de base est faite ensuite par le bleu de méthylène qui remplace l'hématoxyline et l'éosine dont le but est d'améliorer l'observation des coupes. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et prêtent à l'observation microscopique

3.2. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SEM. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives. Le logiciel utilisé dans ce travail est Graph Pad. Prism. V 5.00.

4. Résultats et discussion

Cette étude a été consacrée à l'évaluation *in vivo* de l'effet protecteur des fractions (ACT, BUT) des feuilles de *Lyciumhalimifolium* Mill vis-à-vis de l'intoxication à l'aflatoxine B1, en utilisant un modèle animal.

4.1. L'étude de l'effet antihépatotoxique

4.1.1. Signes de toxicité

Dans les conditions opératoires (administration *per os* de l'aflatoxine B1 à raison de 0.7 mg/kg, aucune mortalité a été observée chez les souris mâles traitées par l'AFB1, en outre, des signes physiques de toxicité sont apparus tel que : la perte d'appétit, perte du poids, faiblesse, accélération du rythme cardiaque et parfois une paralysie. Ces signes sont dus, vraisemblablement, à l'intoxication par l'Aflatoxine B1. Cependant, les souris traitées par les fractions ACT et BUT aucun signe d'intoxication n'a été observé.

Ce résultat se corrobore à l'étude de Gita, (2005) dont il a été signalé que l'intoxication aiguë par les aflatoxines peut se manifester par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids.

Par ailleurs, les premiers symptômes d'exposition d'infection à haut niveau à l'aflatoxine (aflatoxicose aiguë) commence par la diminution de l'appétit, un malaise, ainsi qu'une malnutrition et une croissance ralentie, ensuite, elle se développe par des hémorragies, un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire, ou cancer du foie, ainsi que les troubles de la fonction immunitaire avec un taux élevé de mortalité chez l'animal (Jaime-Garcia et Cotty, 2010).

4.1.2. Évolution du poids corporel des souris

L'évolution du poids corporel des souris au cours de la période de traitement est suivie chaque jour. La figure (39) représente cette évolution :

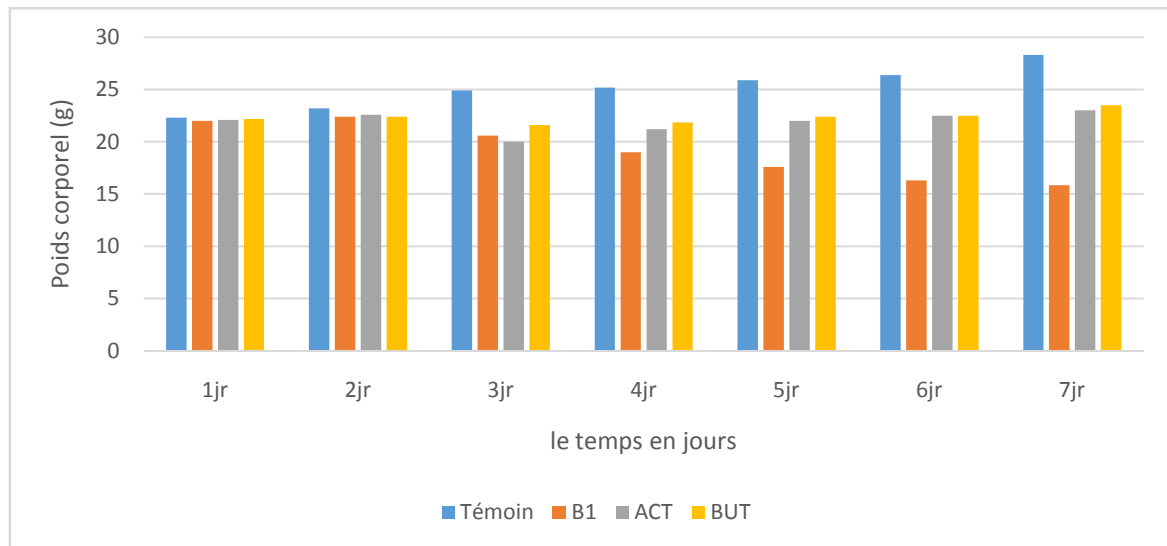


Figure 39. Évolution du poids des souris témoins et traités durant le traitement.

Cette figure montre que le poids corporel du groupe traité par l'AFB1 a connu une diminution importante (28.05%) entre le 1er et le 7ème jour. Par contre, les témoins ont présenté une évolution de leurs poids, évaluée à 25% par rapport au premier jour, dont, le gain du poids est sensiblement remarquable. Par ailleurs, les deux lots traités par les fractions ACT et BUT, ont marqué une chute modérée puis récupération de poids corporel traduisant une légère augmentation du poids par rapport au poids initial estimé entre 4 et 5% respectivement (figure 39).

Le changement du poids corporel au cours de 7 jours est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques administrés (Hilaly *et al.*, 2004). La perte du poids chez les souris intoxiquées est corrélée à l'état physiologique de l'animal, et le mode d'administration. Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation de la nourriture à cause de manque d'appétit, mais également par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée. Ces résultats sont en accord à ceux obtenus par Galtier *et al.*, (1974), qui révèlent que l'intoxication du rat par l'AFB1 entraîne une altération de la croissance pondérale, la persistance de l'effet toxique et probablement la rémanence de la toxine dans l'organisme. Ces résultats sont aussi similaires à ceux cités par Bodin *et al.*, (1975) ; Hatey, (1977) et Molinie, (2004). En ce qui concerne les souris intoxiquées par l'AFB1, Hanak, (2002) avait démontré l'existence d'un ralentissement de la croissance, voir une toxicohépatique chez les animaux d'élevage. D'un autre côté, les études de Pohland *et al.*, (1992); Pfohl-Leszkowicz

et Castegnaro, (1999) ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, (2002) ont montré l'effet délétère des mycotoxines sur différents organes tels que, les intestins, ceci peut conduire à une mauvaise rétention des éléments nutritifs au niveau de l'épithélium intestinal et par conséquent une diminution du poids corporel.

4.1.3. Poids du foie

La variation du poids du foie est représentée sur la figure (40).

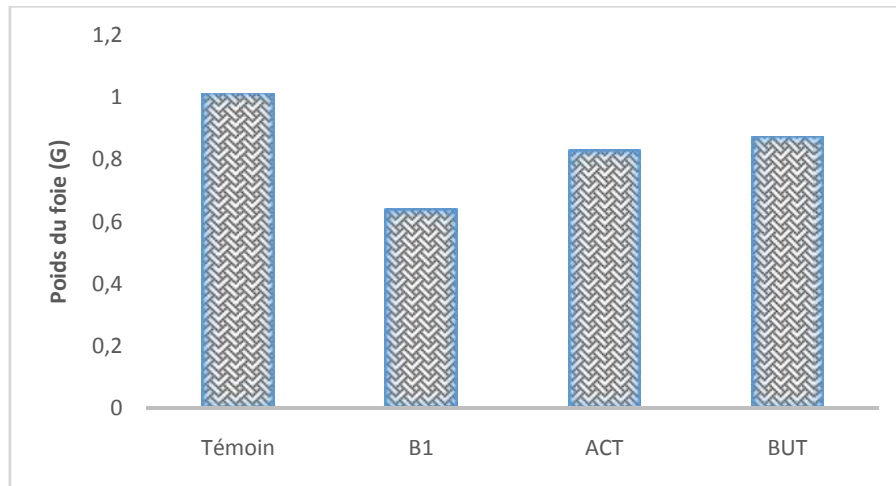


Figure 40. Effet de l'AFB1 sur le poids des foies des souris.

Après 7 jours de traitement, l'analyse des résultats révèle que le groupe intoxiqué par l'AFB1 a présenté des valeurs prééminentes concernant le poids moyen du foie estimé à 0.64g. Le poids du foie des souris traitées par AFB1 montre une diminution remarquable par rapport au poids moyen du foie des souris témoins (1.01g). Cette diminution est due probablement à une intoxication par l'AFB1 consommée durant le traitement, qui peut être expliquée par la destruction des cellules hépatiques (hépatite nécrosante)

Chez les souris traitées par les fractions ACT et BUT utilisées comme un hépato-protecteur, on remarque que le poids du foie est supérieur par rapport au lot intoxiqué par l'AFB1, dont le Poids moyen est entre 0.83-0.87g respectivement. Cette constatation est peut être due à l'effet du traitement appliqué qui aide à réparer ou préserver les lésions des cellules du foie induites et facilite le rétablissement d'une nécrose hépatique.

Dans le cas de l'AFB1, l'intoxication aiguë peut provoquer des signes importants de lésions du foie pouvant induire des congestions voir même des hémorragies pouvant être à l'origine d'encéphalopathies et d'œdèmes pouvant entraîner la mort de l'animal sous l'action d'une

hépatomégalie au bout de quelques heures voir quelques jours. Dans le cas le plus fréquent d'Aflatoxicose chronique, le foie reste la principale cible (Gita, 2005).

L'action de l'AFB1 peut prendre d'autres proportions une fois ingérée. En effet, l'aflatoxine B1 est dégradée et les substances qui en résultent sont parfois plus toxiques que la mycotoxine ingérée (Yiannikouris et Jouany, 2002).

4.1.4. Effet des fractions sur les paramètres de l'hépatotoxicité

Les résultats illustrant les variations des transaminases et les phosphatases alcalines sont montrés par la figure (41).

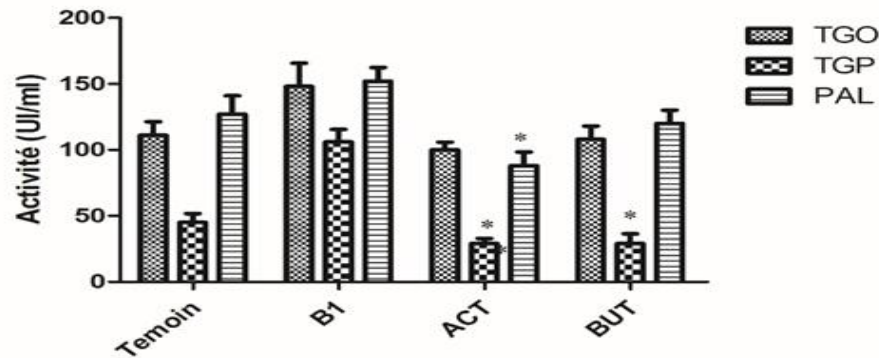


Figure 41. Paramètres sériques de l'évaluation de la fonction hépatique (TGP, TGO et PAL) des souris : témoins, souris traités par la dose de 500mg/kg de l'ACT et BUT et souris intoxiqués par la dose de 0,7mg/kg de l'AFB1. Chaque valeur est représentée en tant que moyen \pm SEM. * p 0.05 différence significative contre le groupe traité par aflatoxine B1.

Les résultats montrent une augmentation remarquable des concentrations des TGP et TGO (hyper-transaminasémie) chez les souris intoxiquée par l'AFB1 par rapport aux lots de souris témoins (Tableau 13). En comparaison avec le lot témoin, le pourcentage de l'augmentation est de l'ordre de 135.55% pour TGP et de 33.33% pour TGO.

Tableau13. Bilan hépatique des groupes de souris traités avec les fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* M (500mg/kg) par rapport au groupe de souris non traitées.

Paramètres (UI/ml)	Témoin	L'aflatoxine B1	La fraction ACT	La fraction BUT
TGO	111 \pm 54.63	148 \pm 23.70	100 \pm 27.79	108 \pm .9.00
TGP	45 \pm 06.78	106 \pm 09.56	29 \pm 03.88	29 \pm 7.49
PAL	127 \pm 14.11	152 \pm 10.37	88 \pm 10.42	120 \pm 10.09

Chaque valeur est représentée en tant que moyen \pm SEM.

Cette augmentation des transaminases pourrait être expliquée par une cytolyse hépatique comme il a été préconisé par Reynier, (2011). Etant donné que la cytolyse hépatique est l'un des principaux et premiers signes de l'hépatotoxicité, nous sommes partis du principe que les taux plasmatiques des transaminases hépatiques TGO et TGP, devraient forcément augmenter sous l'effet de la toxine B1. Ces résultats sont en accord à ceux de Broska et al, (2003) et Nemmiche *et al.*, (2007), qui ont signalé une augmentation significative des transaminases chez les rats intoxiqués au cadmium suite à une atteinte hépatique.

L'AFB1 est une source d'hypertrophie hépatique, ce qui confirme l'hépatotoxicité connue de cette mycotoxine (Tung et Hamilton, 1973 ; Moreau, 1994 ; Denli et Okan, 2006). Autrement dit, l'AFB1 va initier une lipoperoxydation, produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques. Une conséquence de cette activité radicalaire, est la désagrégation des membranes des hépatocytes dont les enzymes intra-cytoplasmiques entre autres les transaminases (AST/GOT et ALT/GPT) et la phosphatase alcaline (PAL) vont se déverser dans le milieu extracellulaire (plasma sanguin), cette fuite qui est associée à une blessure du foie ou/et une inflammation des hépatocytes, entraînant une élévation significative des marqueurs sériques enzymatiques constatée dans le groupe intoxiqué par B1 (Halliwell, 1999 ; Cheng , 2011).

En effet, il est important de signaler que peu de travaux sont réalisés sur les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, la majorité des travaux ont été faits sur le baie de goji (fruit) (Luqet *al.*, 2004 ; BoKang, 2011).

En comparaison avec les témoins, l'analyse des résultats montre également une augmentation importante de l'activité PAL chez les souris intoxiquées par l'AFB1 avec un taux de 19.68% (figure 45). Cette augmentation peut être expliquée par un dysfonctionnement biliaire (atteinte hépatique choléstatique) probablement causé par l'AFB1.

D'après Millanet *al.*, (2005), l'augmentation de taux de l'activité PAL est un signe d'atteinte des voies biliaires observé au cours des hépatites, des cholestases ou des tumeurs comme elle peut être un symptôme de diverses maladies de l'os. Dans le cas de syndrome de cholestase (la diminution ou l'arrêt de la sécrétion de bile par le foie), l'activité de la PAL s'élève, à cause de l'augmentation de la synthèse de l'enzyme stimulée. Cependant, en pratique, l'augmentation de l'activité des amino-transférases et de la PAL sont fréquentes dans les pathologies hépatiques (Lüllmannet *al.*, 1998 ; Marchall et Bangert, 2004). Dans le syndrome de cholestase primaires, il peut y avoir des lésions hépatocellulaires secondaires et une

élévation subséquente de l'activité de GT à la fois dans un marqueur très sensible mais non spécifique de pathologie hépatique.

Dans un autre volé, le taux de TGO des animaux traités par les fractions ACT et BUT est diminué par un taux de 32.44%, 27.03% respectivement par rapport au lot intoxiqué par AFB1. Tandis que le taux de TGP des animaux traités par la fraction ACT et BUT avait une diminution significative ($p < 0.05$) égale à 35.56% pour les deux fractions. Notons que ces taux sont inférieurs à ceux des TGO et TGP des animaux intoxiqués par AFB1 et proches à ceux du lot témoin.

En se référant au lot intoxiqué, la concentration de la PAL est diminuée également chez les souris traitées par ACT avec une diminution significative ($p < 0.05$) égale à 42.11%, et une diminution de l'ordre de 21.06% a été remarquée chez le lot traité par BUT. En outre, la diminution de la PAL après traitement avec fractions testées (ACT, BUT) de feuilles de *Lycium halimifolium* Mill indique que ces derniers exercent un effet hépatoprotecteur.

L'effet hépatoprotecteur des fractions ACT et BUT est justifié par le taux normal (en comparant avec le témoin) de la TGP et TGO chez les lots traités par ces fractions. Donc, l'administration de ces fractions ralentit l'effet de l'aflatoxine B1 et normalise la valeur de ces enzymes. Il est probable que les composés polyphénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes) de BUT et ACT préservent le foie de la toxicité provoquée par l'AFB1.

D'après Maitre, (2011) cette propriété de *Lycium halimifolium* Mill s'explique par sa richesse en composant chimique tels que des peptides cycliques, un glycoside dérivé du tryptophane, des alcaloïdes, des acides phénoliques et des flavonoïdes (Quercétine-3-O-rutinoside, Kaempferol-3-O-rutinoside, acide caféique, acide vanillique et d'autres) et les composés particuliers au *Lycium* à savoir: les polysaccharides qui sont des glycoprotéines formées par un hétéroside et conjugué avec une chaîne polypeptidique.

Selon Xiaqet *al.*, (2012), le *Lycium* est utilisé pour nourrir le foie et, conséquent, bloque les dégâts des toxines, en inhibant la peroxydation lipidique des cellules du foie et empêche la pénétration des toxines en compétition pour les mêmes sites récepteurs sur les membranes cellulaires.

4.1.5. Effet des fractions sur les marqueurs du stress oxydatif

Dans la présente étude, nous avons investi les marqueurs du stress oxydatif générés par l'aflatoxine B1 dans les hépatocytes, et étudié l'effet hépatoprotecteur des deux fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium hlimifolium* M vis-à-vis de l'hépatotoxicité induite par l'aflatoxine B1. La figure (42) présente les différentes variations des paramètres du stress oxydatif.

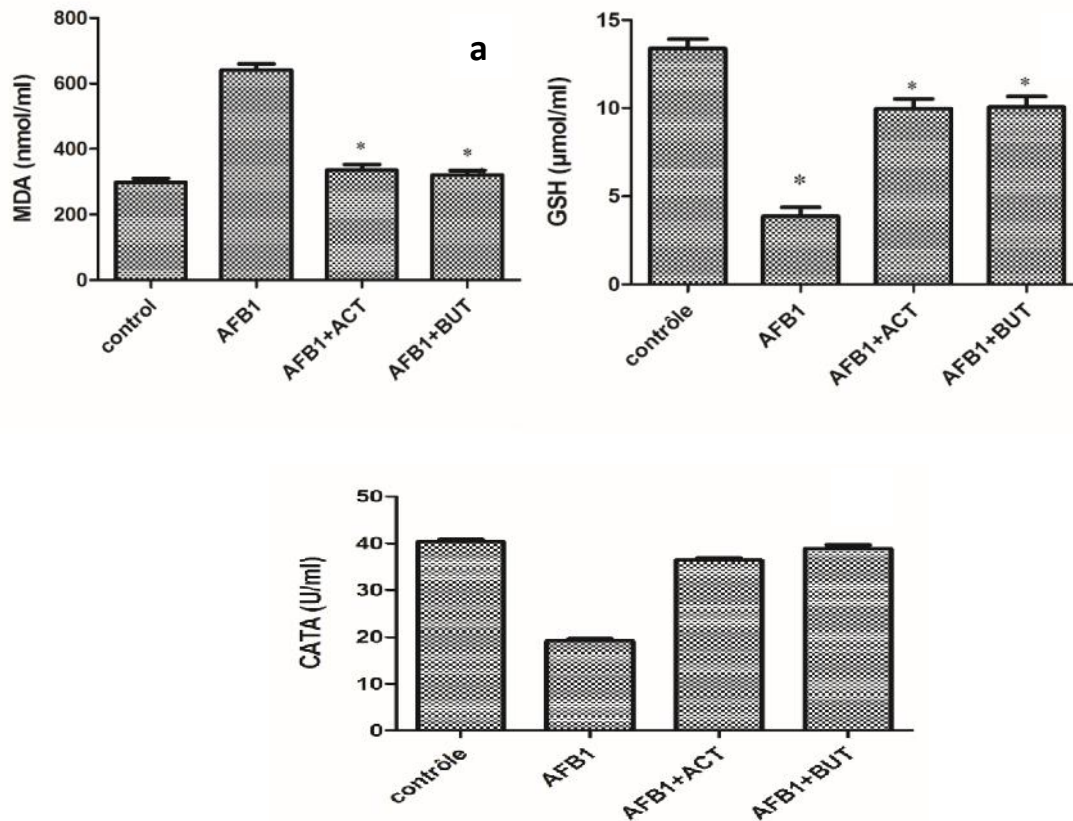


Figure 42. Effet de AFB1, de la fraction ACT et BUT de *Lycium hlimifolium* M sur les paramètres de stress oxydatif. (a): sur la production du MDA dans les cellules hépatiques, (b): sur le niveau de GSH dans le foie, (c): sur la défense enzymatique antioxydante (catalase) dans le cytosol des hépatocytes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, (N = 10); * p < 0.05 différence significative contre le groupe traité par aflatoxine B1.

Tableau 14. Effet des fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill sur certains marqueurs du stress oxydatif tissulaire chez les souris atteintes de l'hépatotoxicité.

Lots Experimentaux	Paramètres		
	MDA (nmoles /gm protein)	GSH (mmol/gm tissue)	Catalase (UI/mg proteine)
Control	298.06 \pm 12.41	13.40 \pm 0.52	40.25 \pm 0.55
AFB1	641.01 \pm 18.35	03.87 \pm 0.50	19.20 \pm 0.46
ACT + AFB1	335.03 \pm 17.96	09.98 \pm 0.55	36.45 \pm 0.50
BUT + AFB1	321.07 \pm 13.11	10.07 \pm 0.60	38.9 \pm 0.70

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, (N = 10).

A partir de la **figure42.a**, nous pouvons constater que chez les souris traitées par l'AFB1, le taux de MDA dans les tissus du foie ~~esta~~ augmenté de manière remarquable (115%) par rapport au témoin. En revanche, les souris recevant le traitement par l'ACT et BUT avant le gavage par aflatoxine B1, ont montré une réduction significative ($p < 0.05$) des taux de MDA dans les tissus hépatiques par rapport au groupe traité par l'aflatoxine B1. Cette observation permet de songer que probablement le prétraitement par la fraction butanolique et la fraction acétate d'éthyle diminuent l'oxydation des lipides chez les souris et normalisent la valeur du MDA en comparaison au groupe intoxiqué.

La **figure42.b** révèle une diminution significative ($p < 0.05$) du GSH chez les souris recevant l'AFB1 par rapport au groupe témoin. Par contre, une augmentation significative ($p < 0.05$) de GSH chez les souris recevant l'AFB1 et prétraitées par l'ACT et BUT, par rapport au groupe intoxiqué.

La **figure42.c** montre que l'administration de l'AFB1 provoque une diminution de l'activité de laCAT chez les souris traitées par l'aflatoxineB1 comparées au groupe normal. Par ailleurs, le prétraitement des animaux par les deux fractions (500 mg/kg), associé avec l'AFB1(0.7mg/kg), a normalisé la teneur cellulaire de la catalase antioxydant dans l'hépatocyte.

D'abord, l'aflatoxine B1 est la toxine la plus répandue et cancérigène des aflatoxines et l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) a classé AFB1 dans le groupe 1 de cancérigène. Des études épidémiologiques ont également indiqué que les régions qui ont des niveaux élevés d'aflatoxines sont corrélés avec une forte incidence du cancer du foie (IARC, 1985 ; 2002).

Les données obtenues dans cette étude montrent que l'aflatoxine B1 induit une importante augmentation de la peroxydation lipidique dans les tissus du foie, traduite par la production de malondialdéhyde (MDA) (Tableau 16). D'après Carampin, (2003), le malondialdéhyde est considéré comme un biomarqueur du stress oxydatif et des dommages cellulaires, et jouer un rôle important dans la toxicité et la carcinogénicité. Ces résultats confirment et élargissent les données précédentes qui ont démontré que les aflatoxines induisent une augmentation significative du MDA *in vivo* (Sirajudeenet al, 2009 ; Banuet al, 2009).

Nous rappelons que l'AFB1 est responsable des dommages des cellules par deux manières différentes: tout d'abord, AFB1 (C17H12O6) métabolisée et activée au niveau du foie par le

cytochrome P450 en AFB1-8,9-époxyde hautement toxique, et forme des adduits principalement à la position N7 de la guanine et est responsable de ses effets mutagènes et cancérogènes (Wang *et al*, 1999).

En second lieu, et en particulier les aflatoxines AFB1 vont initier une lipoperoxydation (peroxydation lipidique). Ainsi, l'oxydation des acides gras polyinsaturés des phosphomembranes lipidiques des hépatocytes, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques.

En revanche, l'administration préventive de la fraction butanolique et acétate d'éthyle de *Lhalimifolium* Mill associés avec l'administration de AFB1, maintient l'équilibre du système redox intrahépatocytaire. Des études ont montrés que l'ajout des lipopolysaccharides (LP) de *Lycium* (glycoprotéines formées par un hétéroside et conjugué avec une chaîne polypeptidique) inhibe l'expression du CYP 450 (2E1) des hépatocytes qui est impliqués dans le métabolisme de détoxification et donc participe à la prévention du stress oxydatif induit par la consommation de la Aflatoxine B1 (Gu, 2007; Xiaqet *al* ; 2012).

Une autre étude a montré que le taux de MDA augmente dans le groupe intoxiqué par l'alcool alors que le lot intoxiqué et traité par LP de *Lycium* révèle un taux de MDA normal par rapport au lot contrôle (Cheng *et al*; 2011).ces résultats reflètent l'effet protectrice de LP de *L halimifolium* Mill sur le stress oxydatif dans le foie, qui est expliqué par le mécanisme antioxydant.

Les polyphénols tel que l'acide protocatechique, peuvent retarder l'oxydation des lipides et servent également de conservateur alimentaire (Chao, 2009).

L'augmentation de la MDA peut être attribuée à l'importante diminution de l'antioxydant non enzymatique (GSH) dans le foie de souris traité avec aflatoxine B1, cette diminution va encore aggraver l'effet de la toxicité de ces mycotoxines. Ces résultats sont en accord avec ceux des études antérieures (Rastogi, 2001 ; El-Agamy, 2010).

Dans la présente étude, les résultats ont révélé une déplétion du GSH hépatique chez les souris traitées par AFB1. Par contre, la teneur hépatocytaire de GSH est maintenue à son niveau cellulaire normal quand les souris ont eu un prétraitement par l'ACT et BUT de *L halimifolium* Mill (Tableau 16).

Le glutathion réduit (GSH), est un antioxydant non enzymatique, constitue la première ligne de défense antiradicalaire (Morin,2009), il joue un rôle essentiel dans la protection des tissus de l'exposition à l'AFB1 par interaction directe avec les ROS ou en tant que cofacteur pour désintoxication enzymatique, et la nécrose du foie commence lorsque les réserves de glutathion sont presque épuisés(Abdel-Wahhab, 2003; 2005). L'épuisement du GSH pourrait être une conséquence d'une conjugaison avec mycotoxine GSH et / ou attaque continue des radicaux libres connus pour générer des réactifs intermédiaires qui se lient à GSH (Glaab, 2001). Cela confirme l'hypothèse que le stress oxydatif, qui est toujours associé à la peroxydation des lipides, est une étape cruciale dans des dommages au foie induite par aflatoxine B1 (Bedard, 2006).

Grâce à leur pouvoir antiradicalaire, les polyphénols présentent dans les fractions de *Lycium* sont en effet capables d'empêcher la chute du GSH en stimulant sa régénération à partir de GSSG suite à la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (Maitre, 2011).

La réduction de l'activité de la CAT est observée dans le cytosol chez les souris traitées par l'AFB1,dont, nous avons observé une chute importante (Tableau 16). Ce résultat peut expliquer une production intensive de H₂O₂ suite au traitement des souris par l'AFB1. Par contre, le prétraitement des souris par la fraction butanolique et l'acétate d'éthyle de *L halimifolium* Mill atténue complètement ces effets, provoque ainsi un processus de restauration de la catalase vers une évolution à la normale. Ces résultats confirment les propriétés antioxydantes des composés phénoliques démontrées dans les travaux de Katalinic, (2006).

4.1.6. Analyse histologique

L'histologie du foie des souris témoins montre une organisation histologique d'un foie normal ; le parenchyme hépatique a une architecture lobulaire conservée, travées hépatocytaires régulières comportant une seule couche d'hépatocytes. Les hépatocytes sont disposés en travées autour des veines Centro-lobulaires distinct et contiennent un noyau central rond, bien net et un cytoplasme granuleux et préserve (figure 43).

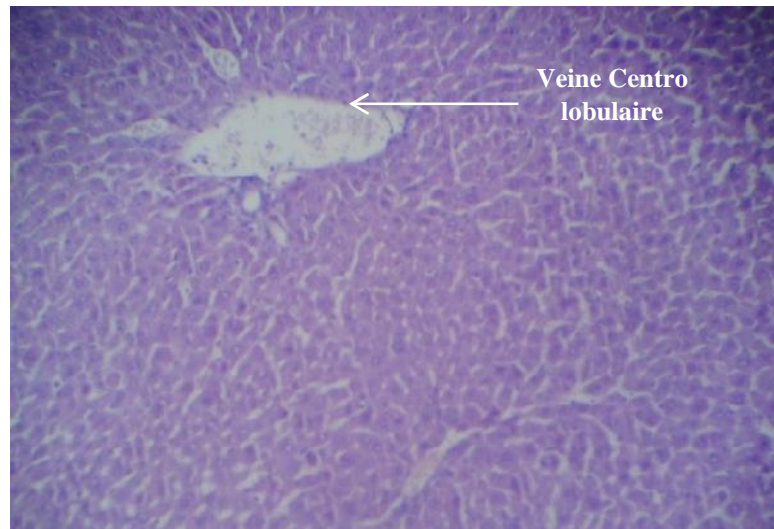


Figure 43. Aspect microscopique du foie de lot témoin (G×40).

Concernant l'histopathologie du foie des souris intoxiquées par l'AFB1, on observe des lésions de nécrose hépatocytaire, juste à côté des zones nécrosées, il y a des hépatocytes clarifiés et ballonnés, autres cellules avec noyau pycnotique, binucléation, des œdèmes et infiltrations des cellules inflammatoires sont parfois présentes (figure44.a), et des lésions centrolobulaires, accompagnée d'une congestion (figure44.b). Selon Newberne Et Butler, (1969), la toxicité dépend de l'âge et du sexe dont, les jeunes et les mâles sont plus sensibles que les femelles, et dans ce cas l'AFB1 provoque une nécrose hépatique au niveau centrilobulaire. Le foie devient enflé, pâle, friable et hémorragique.

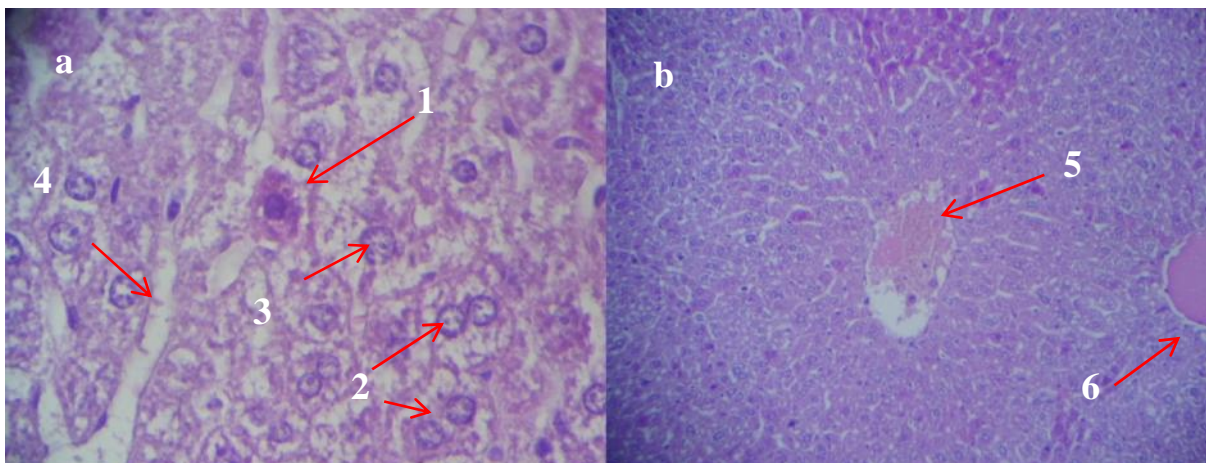


Figure 44. Aspect microscopiques du foie des animaux traités par l'AFB1. (1) : nécrose avec noyau pycnotique (G×100) ; (2) : binucléation (G×100) ; (3) : ballonnisation avec clarification des hépatocytes (G×100) ; (4) : œdème , dilatation et congestion vasculaire (G×100) ; (5) : lésion centrolobulaire (G×40); (6): Congestion (G×40).

L'observation histologique chez les animaux du lot traité avec les fractions de *L halimifolium* Mill puis intoxiqué par B1 (figure.45), montre la présence des congestion, par contre, on note l'absence de lésions de nécrose hépatocyttaire et une dilatation des espaces portes est présente.

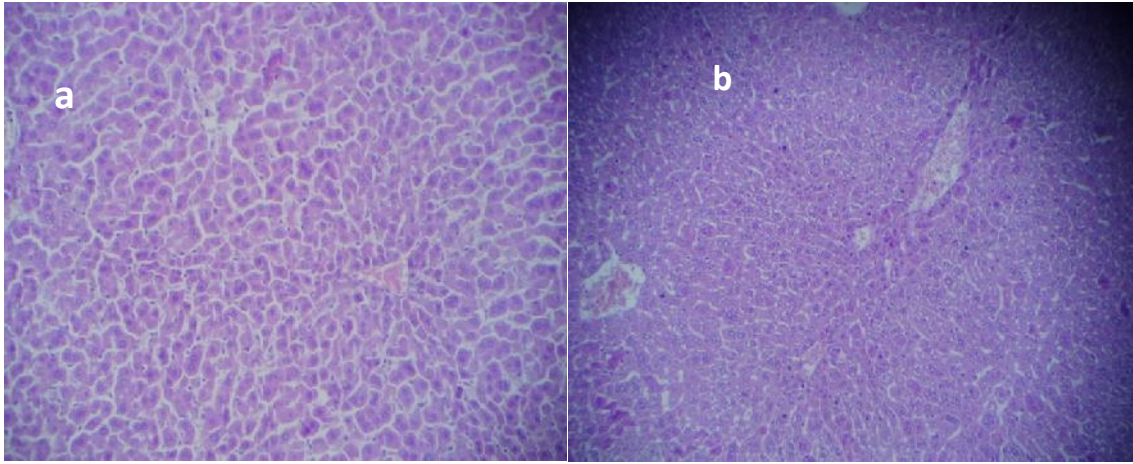


Figure 45.Aspect microscopique du foie des animaux traités par l'ACT(a) et BUT (b) puis intoxiqués par le B1 (G×40).

Par conséquent, les polyphénols présents dans les fractions de *L halimifolium* Mill qui sont douées par le pouvoir antiradicalaire sont capables de régler le taux des paramètres du stress oxydatif. En effet, l'acide protocatechuique est l'un des composants biologiquement actifs de certaines plantes médicinales, y compris celles utilisées en médecine naturelle caractérisé par une activité anticancéreuse et antioxydante très élevée (Aliet al, 2005). Cet acide semble avoir un potentiel chimiopréventif car il inhibe la carcinogenèse chimique et exerce des effets proapoptotiques et antiprolifératifs dans différents tissus. Le mécanisme de l'action chimiopréventive de l'acide protocatechuique est principalement associé à l'activité antioxydante, y compris l'inhibition de la génération ainsi que le balayage des radicaux libres et l'augmentation des enzymes antioxydantes(Tanaka, 2011). Il a été démontré également que l'acide protocatechuique a un effet sur les enzymes (cytochrome P-450) impliqués dans la biotransformation Phase I et II de cancérogènes, et il affecte également l'apoptose pour éliminer les cellules endommagées et néoplasiques(Szaefer, 2004).

Une autre étude indique que l'acide protocatechuique à des doses de 200-2000 ppm dans le régime alimentaire a effectivement inhibé le développement de la plupart des cancers, en particulier du système digestif (Tanaka, 2005).

Un dose administrée de 5 à 10 mg / kg, chez les rats jeunes et âgés pendant 7 jours, l'acide protocatechuique a eu des effets anti-âge. Il a augmenté les activités de GSH-PX et CAT, et a

diminué le taux de MDA des rats âgés. Ainsi, L'acide protocatechique a été jugé utile sur le plan thérapeutique pour minimiser les troubles associées à l'âge où les dommages oxydatifs sont la principale cause (Liu, 2002).

Par ailleurs, Lin *et al.*, (2007) ont montré que la rutine a des effets anticancéreux, elle induisait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans des cellules de leucémie murine (WEHI-3) *in vitro* et *in vivo*.

Douglas *et al.*, (1998) ont montré que l'addition de la coumarine diminue l'activation de l'aflatoxine B1 à l'époxyde 8,9, et diminue ainsi leur toxicité.

En conclusion, la fraction butanolique (BUT) et acétate d'éthyle (ACT) des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill contenant des composés bioactifs, préservent les hépatocytes contre les lésions oxydantes, et jouent donc un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydatif et des modifications histopathologiques produites dans le foie par l'aflatoxine B1.

Conclusion générale

Et perspectives

Le présent travail a pour objectif l'étude phytochimique et biologique d'une plante médicinale ; le *Lycium halimifolium* Mill de la famille de *Solanaceae*, et la détection de ses effets antimycotoxinogène et antihépatotoxique. Cette plante est choisie sur la base de ses usages traditionnels.

Le premier chapitre de cette thèse, est consacré à l'identification macroscopique, microscopique et moléculaire de la moisissure mycotoxinogène, modèle d'étude, cette moisissure est isolée spécialement pour cet objectif des arachides produites à Taref. En effet, l'étude a confirmé que l'isolat est un *Aspergillus flavus* et son numéro d'accès fourni, après l'identification moléculaire, est (gi | 146746162 | EF409803.1).

Le deuxième chapitre, s'inscrit dans le but de faire la lumière sur la phytochimie des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill et l'identification de leurs principes actifs. Pour ce faire, nous avons préalablement effectué un criblage phytochimique préliminaire de différents groupes de métabolites primaires et secondaires contenus dans les feuilles. Cette étude a permis de conclure que les feuilles de la plante étudiée sont riches en ; flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, terpènes et d'autres. La nature des composés chimiques mise en évidence laisse présager des activités pharmacologiques intéressantes. En effet, la recherche de principes actifs a permis de conclure en outre, que les fractions ACT et BUT sont les mieux adaptées et les plus riches en teneurs en polyphénols. Les résultats obtenus dans la présente étude ont révélé que le niveau de ces composés phénoliques dans les diverses fractions extraites étaient intéressants.

L'identification chromatographique a permis de cerner plusieurs composés, il s'agit de quatre acides phénoliques à savoir ; l'acide protocatechique, l'acide gallique, l'acide coumarique, l'acide syringique et un flavonoïde (la rutine) pour la fraction ACT, alors que la fraction BUT contient trois acides phénoliques ; l'acide protocatechique, l'acide syringique, et l'acide coumarique, et un flavonoïde (la rutine). Il est à signaler que ce travail a permis, pour la première fois, d'identifier l'acide protocatechique, l'acide syringique et l'acide gallique dans les fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'activité biologique *in vitro* des fractions précédentes. Le chapitre est réparti en trois parties ; la première fut l'étude de l'activité antifongique sur *A. flavus* des deux fractions où, il a été remarqué que les composés des fractions à une concentration de 2500 µg/ml ont inhibé totalement la croissance mycélienne.

La CMI et la CFS de la fraction BUT ont été estimés à 312 µg/ml, alors que la CMI et la CFS de la fraction ACT étaient de l'ordre de 625 µg/ml. De ce fait, il a été conclu que les fractions ACT et BUT ont un effet antifongique très remarquable sur l'*Aspergillus flavus*.

Dans la deuxième partie, l'activité antimycotoxinogène a été évaluée en utilisant le milieu de fermentation YES. L'analyse chromatographique a montré une activité antimycotoxinogène importante, révélée par l'inhibition de la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la fraction BUT estimée à 96,83%, et un pourcentage d'inhibition de 94,99% a été enregistré par la fraction ACT. En plus, une forte corrélation a été remarquée entre l'activité antimycotoxinogène et le pourcentage de la réduction de biomasse mycélienne dont le taux d'inhibition est de $56.53 \pm 2.74\%$ en présence de la fraction ACT et le taux d'inhibition de biomasse en présence de la fraction BUT est de $65.22 \pm 0.10\%$. Les deux fractions ACT et BUT ont été jugées efficaces et capables d'inhiber la synthèse de l'aflatoxine B1 par l'*Aspergillus flavus*.

La troisième partie, quant à elle, a été consacrée à l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des fractions par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les deux fractions ont présenté des activités antiradicalaires intéressantes, cependant, la fraction BUT s'avérait plus active que la fraction ACT. Les deux fractions sont également soumises à un criblage pour leur possible activité antibactérienne *in vitro* contre six souches de bactéries en employant la méthode de diffusion sur disque. Seulement la fraction BUT était active vis-à-vis *E.coli* et *S.aureus* avec un diamètre de $16 \pm 0.05\text{mm}$ et $19 \pm 0.02\text{mm}$ respectivement.

Dans le quatrième chapitre, l'étude de l'effet antihépatotoxique des deux fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, a montré que les souris qui ont subi le traitement par l'aflatoxine B1 ont connus différents signes de toxicité ; une perte du poids corporel ainsi que le poids du foie, une augmentation des paramètres de l'hépatotoxicité TGO, TGP et PAL, une augmentation de MDA et une diminution des GSH et de la catalase. Alors que, les souris traitées par les fractions ACT et BUT, conjointement avec l'Aflatoxine B1 ont connu une amélioration de leurs poids corporels, une normalisation des taux de TGO, TGP, PAL, une réduction de MDA et une augmentation de la catalase et de GSH. Sur un autre volet, l'étude histologique a montré que les fractions butanolique (BUT) et acétate d'éthyle (ACT) préservent les hépatocytes contre les lésions oxydantes, et jouent donc un rôle protecteur vis-

à-vis du stress oxydatif et des modifications histopathologiques produites dans le foie par l'aflatoxine B1.

Aussi, il a été clairement conclu des résultats obtenus que les fractions Butanolique et Acétate d'éthyle ont un effet protecteur, préventif et curatif vis-à-vis de l'hépatotoxicité par l'aflatoxine B1. En effet, cette étude ouvre une voie importante dans le domaine de la prévention des mycotoxine par l'utilisation des principes actifs d'origine végétale

En perspectives, il serait donc intéressant d'approfondir ce travail par :

- La Purification et l'identification de d'autres molécules contenues dans les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill ;
- La bonne exploitation de ces procédés naturels pour la préservation des aliments contaminés par les mycotoxines ;
- Il est enfin intéressant d'étudier les mécanismes de l'inhibition par les extraits des feuilles de la plante *Lycium halimifolium* Mill de la biosynthèse de l'AFB1 par *A. flavus*.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude antimycotoxinogénèse et antihépatotoxique de deux extraits de feuilles de la plante *Lycium halimifolium* Mill.

Deux isolats fongiques ont été obtenus à partir des grains d'arachides, et un seul isolat qui présente des caractéristiques du genre *Aspergillus*. a été sélectionné. L'identification moléculaire a confirmé que l'isolat sélectionné est un *Aspergillus flavus*, avec une similarité de 99%, enregistré sous le code d'accèsion (gi | 146746162 | EF409803.1), cette souche a servi pour l'étude des effets précédemment cités.

L'évaluation préliminaire de la composition des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs groupes chimiques en l'occurrence, les flavonoïdes, alcaloïdes, les terpènes, les saponosides. Cette évaluation a été confirmée par une analyse quantitative. Les résultats obtenus ont montré que, les deux fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill ont présenté des teneurs considérables en polyphénols estimés à 61.66 ± 0.042 et 60.21 ± 0.102 μg EAG/mg PS, respectivement et celles des flavonoïdes ont montré aussi des valeurs intéressantes estimées à 25.18 ± 0.014 pour ACT et 17.79 ± 0.015 μg EQ/mg PS pour BUT. En revanche, des teneurs faibles en tannins ont été obtenus et estimés à 5.872 ± 0.053 (ACT) et 7.058 ± 0.013 μg EC/mg PS (BUT).

L'identification chromatographique de la fraction ACT a permis de caractériser quatre acides phénoliques: l'acide protocatechique (19.29%), l'acide gallique (0.499%), l'acide coumarique (0.386%), l'acide syringique (0.142%) et un flavonoïde (la rutine) (12.58 %). Alors que la fraction BUT contient trois acides phénoliques: l'acide protocatechique (20.32%), l'acide syringique (0.236%), et l'acide coumarique (0.124%), et un flavonoïde (la rutine) (2.098 %). Il a été signalé que le présent travail a permis pour la première fois de mettre en évidence la présence l'acide protocatechique, l'acide gallique et l'acide syringique dans les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

L'étude de l'activité antifongique, a permis d'estimer la CMI et CFS de la fraction BUT à 312 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et de 625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour la fraction ACT. L'activité antimycotoxinogénèse de *Lycium halimifolium* Mill a révélé une inhibition de la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la fraction BUT estimée à 96,83%, et un pourcentage d'inhibition de 94,99% a été trouvé par la fraction ACT. Cette inhibition a été en corrélation avec le pourcentage de la réduction de biomasse mycélienne dont le taux d'inhibition de biomasse est de $56.53 \pm 2.74\%$ en présence de la fraction ACT et de $65.22 \pm 0.10\%$ en présence de la fraction BUT. L'évaluation de l'activité antioxydante des deux fractions a montré que la fraction BUT était plus active que la fraction ACT. L'activité antibactérienne a révélé que la fraction BUT a un effet positif vis-à-vis *E.coli* et *S.aureus*.

L'étude de l'effet antihépatotoxique des deux fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, a montré que les souris traitées par ACT et BUT ont connus une normalisation des taux de TGO, TGP, PAL en comparaison avec le témoin, ainsi que la standardisation des paramètres du stress oxydatif. L'étude histologique a montré que les deux fractions préservent les hépatocytes contre les lésions oxydantes, et jouent donc un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydatif contre les modifications histopathologiques produites par l'aflatoxine B1. En conclusion, ce travail est le premier à avoir démontré l'activité antimycotoxinogénèse et antihépatotoxique des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

Mots clés : *Lycium halimifolium* Mill, *Aspergillus flavus*, Aflatoxine B1, Antimycotoxinogénèse, Antihépatotoxique.

Abstract

This work deals with the antimycotoxinogenesis and antihepatotoxicosis study of *Lycium halimifolium* Mill.

Two fungal isolates were obtained from the peanut kernels, including a single isolate with similar characteristics to the genus *Aspergillus* sp. has been selected. Molecular identification confirmed that the selected isolate was an *Aspergillus flavus* registered under accession code (gi | 146746162 | EF409803.1) with a similarity of 99%.

The preliminary evaluation of the composition of *Lycium halimifolium* Mill leaves revealed the presence of several chemical groups, the alkaloids, the terpenes and the saponosides. This latter was confirmed by a quantitative analysis. The obtained results showed that ACT and BUT fractions of *Lycium halimifolium* Mill leaves showed considerable polyphenol contents estimated at 61.66 ± 0.042 and 60.21 ± 0.102 μg EAG / mg PS, respectively. Whereas, those of the flavonoids also showed interesting values estimated at 25.18 ± 0.014 for ACT and 17.79 ± 0.015 μg EQ / mg PS for BUT. In contrast, low tannin levels were obtained and estimated at 5.872 ± 0.053 (ACT) and 7.058 ± 0.013 μg EC / mg PS (BUT).

Chromatographic identification of the ACT fraction allowed to characterize four phenolic acids: protocatechic acid (19.29%), gallic acid (0.499%), coumaric acid (0.386%), syringic acid (0.142 %) and a flavonoid (rutin) (12.58%). While the BUT fraction contains three phenolic acids: protocatechic acid (20.32%), syringic acid (0.236%), and coumaric acid (0.124%), and a flavonoid (rutin) (2.098%). It has been reported that protocatechic acid, gallic acid and syringic acid are identified for the first time in the present work on *Lycium halimifolium* Mill leaves.

The antifungal activity allowed to estimate the MIC and CFS of the BUT fraction at 312 μg / ml and 625 μg / ml for the ACT fraction. The antimycotoxinogenic activity of *Lycium halimifolium* Mill showed an inhibition of aflatoxin B1 secreted by the BUT fraction estimated at 96.83%, and a percentage of inhibition equal to 94.99% was found by the ACT fraction. This activity was correlated with the percentage of reduction in mycelial biomass with a biomass inhibition rate of $56.53 \pm 2.74\%$ in the presence of ACT fraction and $65.22 \pm 0.10\%$ in the presence of BUT fraction. The Evaluation of antioxidant activity of the two fractions showed that the BUT fraction was more active than ACT fraction. The Antibacterial activity revealed that the BUT fraction had a positive effect on *E. coli* and *S. aureus*.

Finally, the study of the antihepatotoxicity effect of the two fractions of *Lycium halimifolium* Mill leaves, showed that the mice treated with ACT and BUT experienced a normalization of the rates of TGO, TGP, PAL, as well as the standardization of the parameters of the oxidative stress. The histological study showed that both fractions preserved the hepatocytes against the oxidative lesions and thus played a protective role against oxidative stress against the histopathological changes produced by aflatoxin B1. This work is the first to have exhibited the antimycotoxinogenic activity and antihepatotoxicosis of *Lycium halimifolium* Mill leaves.

Key words: *Lycium halimifolium* Mill, *Aspergillus flavus*, Aflatoxin B1, Antimycotoxinogenesis, Antihepatotoxicosis.

يتركز هذا العمل

يلمستخلصين من أوراق

Lycium halimifolium Mill

تم الحصول على اثنين من العزلات الفطرية من حبات الفول السوداني، تم اختيار هذه العزل لها
Aspergillus sp.، ومن خلال البنية الجزيئية تم التأكد أنها *Aspergillus flavus* مع نسبة تشابه تقدر
%99 (gi|146746162 | EF409803.1)، استخدمت هذه السلالة في دراسة التأثيرات

التقييم الأولي للمكبات الكيميائية *Lycium halimifolium* M. بينت أنها تحتوي على العديد من
المجموعات الكيميائية والمتمثلة في الفلافونويدات، الفلويدات، التربينات و الصابونيات. هذا التقييم تم تأكيده كذلك بواسطة
التحليل الكمي. النتائج المتحصل عليها بينت أن مستخلص اسيتات الاثيل والبيوتانول *L.halimifolium*
M يحتوي على أكبر كمية من عديدات الفينول 61.66 ± 0.042 mg 60.21 ± 0.102 μ g EAG/على الترتيب،
لفلافونويدات قدرت بـ 25.18 ± 0.014 ACT 17.79 ± 0.015 mg/EQ μ g
BUT ومن ناحية أخرى سجلت اقل كمية لتينينات بـ 5.872 ± 0.053 EC μ g mg/ (ACT)
 7.058 ± 0.013 mg /EC μ g (BUT).

الدراسة الكروماتوغرافية بينت أن مستخلص اسيتات الاثيل يحتوي على أربع أحماض فينولية تتمثل في :
protocatechique(%19.29) gallique(%0.499) coumarique(%0.386)
syringique(%0.142) فلافونويد يـ rutine (12.58%) . في الحين تبين أن مستخلص
البيوتانول به ثلاث أحماض فينولية : protocatechique(%20.32) syringique(%0.236)
coumarique(%0.124) مركب الفلافونويدي(rutine) (2.098%). أفادت دراستنا انه
protocatechique gallique syringique *Lycium halimifolium* .Mill

دراسة النشاط المضاد للفطريات سمح بتحديد قيم CMI CFS لمستخلص البيوتانول بـ 312μ g/ml 625μ g/ml
مستخلص اسيتات الاثيل. اظهر *L.halimifolium* M تثبيط إفراز الافلاتوكسين
Aspergillus flavus B₁ البيوتانول 96.83% أما مع مستخلص اسيتات الاثيل
نسبة التثبيط 94.99 . هذا النشاط له ارتباط مع انخفاض الكتلة الحيوية للمسيليوم حيث قدرت نسبة تثبيط نمو
 56.53 ± 2.74 % مع مستخلص اسيتات الاثيل 65.22 ± 0.10 %
البيوتانول. الفعالية المضادة للأكسدة لكلا المستخلصين بينت أن المستخلص البيوتانول يتميز بفعالية عالية مقارنة بمستخلص
اسيتات الاثيل. النشاط ضد البكتيريا كشف أن المستخلص البيوتانول له فعالية ايجابية ضد السلالتين *S.aureus*. *E.coli*

في الأخير بينت دراسة التأثير *Lycium halimifolium* Mill
البيوتانول واسيتات الاثيل المقاييس معايير الأكسدة. أظهرت الدراسة النسيجية أن كلا المستخلصين حافظت على خلايا الكبد ضد الآفات
الأكسدية، وبالتالي لعبت دورا وقائيا ضد الإجهاد التأكسدي ضد التغيرات النسيجية التي تنتجها الأفلاتوكسين B₁.
هذا العمل يعتبر الأول في عرضه لـ

Lycium halimifolium Mill

مفتاحية: *Aspergillus flavus* *Lycium halimifolium* Mill، أفلاتوكسين B₁

VALORISATION

PUBLICATIONS

1. **Mosbah Camelia**, Asma Milet, Mounira Kara ali, Imen Talhi and Nouredine Kacem Chaouche. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* isolated from peanut seeds using *Lycium* leaves fractions. *African journal of microbiology research*. 2017. 11(9) : 391-399.
2. **Mosbah Camelia** , Boukaloua A, Mosbah A, Cherfia R, Kacem chaouche N. Hepatoprotective effect of fractions of *Lycium halimifolium* Mill leaves on aflatoxicosis in mice.(En soumission).
3. **Mosbah Camelia**, Mosbah A, Benbout A, Kacem chaouche N. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of fractions obtained from leaves of *Lycium halimifolium* Mill. (En soumission).

PROJETS DE RECHERCHE

1. Recherche de substances d'origine microbienne et végétale développant des potentialités antifongiques, antimycotoxynogènes et antimycotoxycogènes. Code : F00920140067. Chef de projet : Kacem chaouche N.
2. L'effet de la pollution sur la biodiversité animal dans les zones humides des hautes plaines de l'est Algérien. Code : F03020140004 ; Chef de projet : Boulakhssaim M.

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES ET NATIONALES

1. **MOSBAH CAMELIA**. The antimycotoxinogenesis activity of *Lycium halimifolium* Mill. IAP 7/44 Meeting - Integrative Protein Science: from small molecules to complex biological systems iPros. Leuven Institute for Ireland in Europein Leuven. **Leuven**. December 3, 2015. (Communication orale).
2. **MOSBAH CAMELIA**. The antihepatotoxicose effect of *Lycium halimifolium* Mill. 13th Annual Meeting of the SFMBBM Doctoral School. Universitélibre de Bruxelles(ULB). **Bruxelles**. Novembre 6th, 2015 (Communication orale).

3. **MOSBAH CAMELIA**, Talhi Imene, MiletAsma, Cherfia Radia, Kacem Chaouche N. Evaluation of antifungal and antimycotoxinogenesis of *Lycium halimifolium* Mill leaves from Algerian origin. 27ème Congrès international de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB). l'Hôtel Laico, Hammamet– **Tunisie**. du 28 au 31 Mars 2016. (Communication orale).
4. **MOSBAH CAMELIA**, Mosbah A, Benbout A, Kacem Chaouche N. 30^{ème} séminaire International Médico_chirurgical et dentaire. **Mila**. les 12_13-14 juin 2013.
5. **MOSBAH CAMELIA**, Benbout A. Valorisation des feuilles de *Lycium* d'origine Algérienne. 4ème journées Internationales de nutrition. **Sétif** ; le 23-24 février 2017.
6. **MOSBAH CAMELIA**. Hepatoprotective effect of *Lycium halimifolium* Mill.3ème séminaire medical national. **Batna**. 18-19-20 Mai 2017.
7. **MOSBAH CAMELIA**, Benbout A, Kacem Chaouche N. La contribution de l'étude phytochimique et biologique de *Lycium halimifolium* Mill. 7ème congrès international de biotechnologie et valorisation de bio-ressource. **Tunisie**. Le 22-25 Mars 2017.
8. Zellagui Ammar, **MOSBAH CAMELIA**, Benbot A, Mosbah A. Bioactive molecules:Source, Identification, Application and modelling. **Oum El Bouaghi**, le 18 Avril 2017.
9. Benbot Amel, **MOSBAH CAMELIA**. L'actiivité biologique des extraits de *Peganumharmala* L. 3ème séminaire medical national. **Batna**. 18-19-20 Mai 2017.
10. BenbotAmel, **MOSBAH CAMELIA**, Yahia A. Anti-diabetic activity of aqueous extract of *Peganumharmala* roots in streptozotocin-induced-diabetic rats.4ème journéesInternationales de nutrition. **Sétif**; le 23-24 février 2017.
11. Benbout A, **MOSBAH CAMELIA**,Yahia A. Evaluation antidiabetic activity of *Peganum harmala* roots in diabetic rats. 7ème congrès international de biotechnologie et valorisation de bio-ressource. **Tunisie**. Le 22-25 Mars 2017.

Références bibliographiques

-A-

- Abdel-Ghani NT, Hegazy AK, El-Chaghaby GA. (2009). Typha domingensis leaf powder for decontamination of aluminium, iron, zinc and lead: Biosorption kinetics and equilibrium modeling. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 6 (2): 243-248.
- Abdellah Zinedine. Determination des mycotoxines dans les aliments et etude de la reduction des aflatoxines par les bacteries lactiques isolees des ferments panaires traditionnels. Spécialité : Biologie, Option : Microbiologie, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc. (2004).
- Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. (2003). Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res.* 48(5):461-5.
- Agban A, Gbogbo Ka, Hoekou Yp, Atchou K, Tchacondo T, Batawila K, Souza C Et Gbeassor M. (2013). Évaluation de l'activité antifongique des extraits de *Cassia alata L.* et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. (Fabaceae) sur *Candida albicans*. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7(3): 1041-1047.
- Alcama EI. (1984). Fundamentals of Microbiology. Ed: Addison-Wesly publishing company, London. pp: 310-341
- Ali BH, Al Wabel N. (2005). Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxico-logical aspects of *Hibiscus sabdariffa L.* *Phytother. Res.* 19:369-75.
- Ali MB, Hahn EJ and Paek KY. (2005). CO₂-induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng C.A. Mayer* roots: role of antioxidants and enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry.* 43: 449-457.
- Alitonou GA, Noudogbessi JP, Sessou P, Tonouhewa A, Avless F, Menut C, Dominique C K. (2012). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore. from Benin. *International Journal of Biosciences (IJB).* 2(9): 1-12.
- Altschul SF et al. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.

- Amagase H, Farnsworth N. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium* fruit (Goji). *Food Research International*. 44(7): 1702-1717.
- Asao T, Büchi G, Abdel-kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. (1965). Structures of aflatoxins B and G1. *Journal of American Chemical Society*. 87: 822-826.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* .89: 27-36.
- Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 93(374):43

-B-

- Ba K, Tine E, Destain J, Cisse C, Thonart P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 14(1): 131-139.
- Badiaga M. Etude ethnonotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* S une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Spécialité : chimie organique, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, (2011).
- Balbaa SI, Hilal SH et Zakia AY. (1981). Medicinal plant constituent: General Organisation For Univ and School Books. 3rd ed. Cairo Publisher, Egypt. pp: 424-437.
- Bankole, S. A. and Adebajo, A. 2003. Aflatoxin contamination of dried yam chips marketed in Nig. *Trop. Sci*. 43: 3-4.
- Banso A et Adeyemo SO. (2007). Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. *African Journal of Biotechnology*. 6: 1785-1787.
- Banu MNA, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Matsuoka K, Nakamura Y, Shimoishi Y. (2009). Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Plant Physiol*. 166: 146–156.
- Barros, L., Baptista, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*. 45 : 1731–1737.
- Batawila K., Kokou K., Akpagana K., Koumaglo K. et Bouchet P. (2002). Activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togolaise : *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. Var. *lineariloba* (DC) O. Hoffm. (Asteraceae). *Acta. Bot. Gallica.*, 149(1): 41-48.

- Bedard LL, Massey TE. (2006). Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett.* 241 :174–183.
- Bekkara F, Jay M, Viricel MR. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant Soil.* 203: 27-36.
- Belli N, Marin S, Sanchis V et Ramos, AJ. (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology.* 96: 19-27.
- Ben Arfa A, et al. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol.* 43(2):149-54
- Benhamou N., Chet I. (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 2095–2099.
- Bennett, J. W; Klich M. (2003). Mycotoxins. American Society for Microbiology.16: 497-516.
- Benromdhane S, Romdhane MN , Feki M , Sanhagi H , Kaabachi N , M'Bazaa A. (2003). Blood biochemistry parameters in dromedary (*Camelus dromedarius*). *Med Vet.* 154 : 695-702.
- Bhat RV, Krishnamachari KA. (1977). Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. *Indian J Med Res.* 66(1):55–8.
- Bhatnagar D, Lillehoj EB et Bennett JW. (1991). Biological detoxification of mycotoxins. In: Smith JE, Henderson RS Ed, *Mycotoxins and Animal Foods*, Boston: CRC press, pp 816-826.
- Bodin G, Galthier P, Moré J. (1975). Toxine d'*Aspergillus ochraceus* : toxicité de l'ochratoxine A par administration orale prolongés chez le rat. *Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions.* 5 (2) : 207-218.
- Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra.*
- Bondet V., Williams W.B. et Berset C. (1997). Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 30:609-615.
- Bonnier G. (1990). *La grande flore en couleurs* de Gaston Bonnier, Editions Belin, Paris.

- Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Editions Tech & Doc., Lavoisier,
- Botton, B., Breton, A., Fever, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P *et al.* (1990). Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle.(2^{ème} éd). Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-381.
- Boudiaf K. Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de doctorat .Setif. (2006).
- Bouhet S, Oswald IP (2005). The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell derived innate immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108: 199-209.
- Boulila, A., Mattoussi, K., M'rabet, Y., Rokbeni, N., Dhouioui, M., Boussaid, M. (2015). Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss.*Food Chemistry.* 174: 577–584.
- Boullard B. (2001). Plantes médicinales du monde réalités et croyance. Paris Editions Estem, 636p.
- Bressac B, Kew M, Wands J and Ozturk M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature.* 350 : 429–431.
- Broska M, Moniuszko M and Pilat M. (2003). Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium. *Environ. Med.* 38: 2-20.
- Brown, K. L., et al. (2009). Inherent Stereospecificity in the Reaction of Aflatoxin B18,9-Epoxide with Deoxyguanosine and Efficiency of DNA Catalysis. *Chemical Research in Toxicology*, 22(5) : 913-917.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} edit. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, pp : 442- 448.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} edit. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. pp : 784- 958.

-C-

- Cahagnier, B., Dragaci, S., Frayssinet, *Cet al* (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. Technique et Documentation. Lavoisier. France.
- Carampin P, Rosan S, Dalzoppo D, Zagotto G, Zatta P. (2003). Some biochemical properties of melatonin and the characterization of a relevant metabolite arising from its interaction with H₂O₂. *J Pineal Res.* 34(2):134-42.

- Carlborg FW. (1979). Cancer mathematical models and aflatoxin. *Food Cosmet Toxicol.* 17: 159 -166.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA). Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, Task force report No. 139 / January 2003.
- Castegnaro M. (1999). Risques cancérogènes - Les aflatoxine. In “Les mycotoxines dans l’alimentation : évaluation et gestion du risque” de conseil supérieur d’hygiène publique de France. Technique et Documentation, Paris.
- Chandrashekar G. (1989). Groundnut trade in India and the world: Implications of aflatoxin contamination, Proceedings of International Workshop of International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, pp 39-43.
- Chao CY, Yin MC. (2009). Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogens and Disease.* 6(2) :201–206.
- Chapelard- Leclerc F, Papon N, Noël T et Villard J. (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Française des Laboratoires.* 373.
- Chen G, Chen H. (2011). Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. *Food Chem.*, 126, pp 1934-1938.
- Chen SY, Chen CJ, Chou SR, Hsieh LL, Wang LY, Tsai WY et al (2001). Association of Aflatoxin B1–albumin adduct levels with hepatitis B surface antigen status among adolescents in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarker.* 10 (11): 1223-1226
- Cherouana S, Touil A, et Rhouati S. (2013). Two flavonoid glycosides from *Lycium arabicum*. *Chemistry of Natural Compounds.* 49(5): 930–931.
- Chitarrini G, Nobili C, Pinzari F, Antonini A, De Rossi P, Del Fiore A. (2014). Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Int J Food Microbiol.* 189:1-10
- Chong KP, Atong M et Rossal S. (2012). The role of syringic acid in the interaction between oil palm and *Ganoderma boninense*, the causal agent of basal stem rot. *Plant. Pathol.* 61: 953–963
- Clairborne A. (1985). Catalase activity. In: Greenwald RA (ed) CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 283-4.
- Coker R. D. (1996). Mycotoxins. In Groundnuts, second edition, Pests Control Series, Nri (ed.), Natural Resources, Chatham, Royaume-Uni. pp 335-348.

Coppock WR, Christian RG. (2007). Aflatoxins. *In: Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles*. Gupta RC, San Diego. pp. 939-950.

Cyboran S, Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Zylka R, Oszmian'ski J, et Kleszczyn'ska H. (2014). Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Research International*. 65: 47–58.

-D-

D'mello JPF & Macdonald AMC. (1997). Mycotoxins.- Animal Feed . *Science Technology*. 69: 155-166.

Dao H. P. caractérisation de certains gènes polycétones synthase chez *Aspergillus ochraceus* nr1 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide pénicillique. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, (2005).

Davis TN, Sugiura M. (1966). Auroral electrojet activity index AE and its universal time variations. *Journal of Geophysical research*. 71(3): 785–801.

Deabes M M, Darwish H R, Abdel-Aziz K B, Farag I M, Nada S and Tawfek N S. (2012). Protective Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Aflatoxins-Induced Toxicities in Male Albino Mice. *J Environment Analytic Toxicol*. 2:3

Deabes MM, Darwish HR, Abdel-Aziz KB, Farag IM, Nada A and Tawfek NS. (2012). Protective Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Aflatoxins-Induced Toxicities in Male Albino Mice. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*. 2:3.

Delarras Camille. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. pp : 128, 129, 269, 271.

Delaveau, P. (2003). Expliquez-moi les plantes, voyage en botanique, Paris, Editions Pharmathèmes.

Denli M, Okan F. (2006). Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B1 in broiler diets. *South African Journal of Animal Science*. 36: 110-118.

Desmeules J, Bonnabry P and Dayer P. (1999). Hepatic metabolism of drugs. *Clinical Hepatology Journal*. 1: 145-164.

Dial JM, et al. (2007). Inhibition of APCCdh1 activity by Cdh1/Acm1/Bmh1 ternary complex formation. *J Biol Chem*. 282(8):5237-48.

- Diallo D, Sanogo R, Yasambou H, Traoré A, Coulibaly K and Maiza A. (2004). Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie.*, 7: 1073-1080.
- Didem DO, Berrin Ö, Selda Ö, Fatma E. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* 165: 496-504
- Dikbas N, Kotan R, Dadasoglu F, Sahin F. (2008). Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 124(2):179-182
- Dilkin P. (2002). Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. *Biológico*, 64(2): 187-191.
- Djeridane A, Yousfia M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*97: 654-660.
- Djeridanea A, Yousfia M, Nadjemib B, Boutassounaa D, Stockerc P, Vidal N et al . (2005). Phytochemical, pharmacological and toxico-logical aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. *Phytother. Res.* 19:369-75
- Do JH, Choi DK. (2007). Aflatoxins: Detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 585–593
- Dong JZ, Lu da Y, Wang Y. (2009). Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L. *Plant Foods for Human Nutrition.* 64(3): 199–20.
- Dorner JW, Cole RJ, Diener UL. (1984). The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia.* 87 (1-2):13–15
- Douglas EG, Karl EA, Abraham WH. (1998). Coumarin chemoprotection against aflatoxin B1-induced gene mutation in a mammalian cell system: A species difference in mutagen activation and protection with chick embryo and rat liver S9. *Environ. Mol. Mutagen.* 32: 64-74
- Doyle MP et Marth EH. (1978). Bisulfites degrades Aflatoxins: Effect of temperature and concentration of bisulfite. *J Food Prot*, 41: 891-896.
- Dupont F et guignard J L. (2012). Botanique: Les familles de plantes. 15^{ème} édition, elsevier masson, pp 62-79.
- Duraipandiyam et Ignacimuthu. (2011). Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* S204-S215.

- Eaton DL, Gallagher EP. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*34: 135–172.
- Ebrahimi NS, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, et Yousefadi M. (2008). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. 110 : 927-931.
- El Khouri A.. Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse Présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. (2007).
- El-Agamy DS. (2010).Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*. 84(5):389-96.
- Ellis WO, Smith PJ, Simpson BK, Khanizadeh S, Oldham JH. (1993). Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*. 10 : 9-21.
- Ellman GL. (1959). Plasma antioxidants. *Arch Biochemistry & Biophysics*. 82 : 70-7.
- Evans WC. (2002). Pharmacognosy. 15thed, Elsevier science limited, New York. pp: 156-200.
- Ezekiel, C.N., Alabi, O.A., Anokwuru, C.P. and Oginni O. 2011. Studies on dietary aflatoxin-induced genotoxicity using two in vivo bioassays. *Archives of Applied Science Research* 3(2): 97–106.

-F-

- Fakruddin Md, Chowdhury A, Nur Hossain Md, and Morshed MA. (2015). Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. *Springerplus*. 4: 159.
- FAO. Alimentation et nutrition - 10. Prévention des mycotoxines. FAO-ROME, 1979. P : 55.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanisme biochimiques*.5 :108-115.
- Firmin, S. (2011). Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Nutrition et sciences des aliments. Université d'Auvergne.

- Fitzerald JM, Collin NR. (1998). Towers. Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Lett. Appl. Microbio.* 26(1):17-21.
- Frisvad JC, Filtenborg O. (1983). Classification of *terverticillate Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol* 46:1301-1310.
- Frisvad JC, Thrane U. (1987). Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *Journal of Chromatography A.* 404(1): 195–214.
- Fukuda H, Kondo A, Noda H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng.* 92 :405–16.

-G-

- Gabal MA, Hegazi SA, Hassanin N. (1994). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Vet Hum Toxicol.* 36 : 519-521.
- Gacem MA. Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Magister en biologie, Option : Microbiologie appliquée. (2011).
- Galtier P, Loiseau N, Oswald Ip et PuelO. (2005). Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bull. Acad. Vét.* 159 (1).
- Galvano, F., A. Piva, A. Ritieni, G. Galvano (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Protect.* 64: 120-131.
- Gan, L. et al., (2001). Inhibition the growth of human leukemia cells by *Lycium barbarum* Polysaccharide. *Wei Sheng Yan Jiu* .30 (6): 333-335.
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology.* 59: 1-10.
- Ghnimi W. Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété antioxydante et leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat. Université De Lorraine. (2015).
- Ghorbanian M, Razzaghi-Abyaneh M, Allameh A (2008). Study on the effect of neem (*Azadirachta indica* A. juss) leaf extract on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin by it at different incubation times. *Mycoses.* 51:35-39.

- Ghuysen JM. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* : 45: 37–67
- Giorni P, Battilani P, Pietri A, Magan N. (2008). Effect of awand CO2 level of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post- harvest. *International Journal of Food Microbiology*. 122: 109-113.
- Gita R P. (2005). Afltoxin, kwashiorkor, and morbidity. *Nat Toxins*. 2 : 1-3.
- Gong L et al (2016). LbCML38 and LbRH52, Two Reference Genes Derived From RNA-Seq Data Suitable for Assessing Gene Expression in *Lycium Barbarum* L. *Sci Rep*. 6; 37031.
- Gopal, D.V; Rosen, H.R. (2000). Abnormal findings on liver function tests. Interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. *Postgrad Med*. 107(2):100-2, 105-9, 113-4.
- Gqaleni N, Smith J E, Lacey J and Gettinby G. (1997). Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl. Environ. Microbiol*. 63.(3): 1048-1053.
- Grevenstuk T, Van der Hooft JJJ, Vervoort J, Gonçalves S, Romano A. (2009). Identification of antimicrobial agents from *Drosera intermedia* using HPLC-MS/HPLC-SPE-NMR. *Planta Med*. 75 - PA34.
- Gu S,Wang PL, Jiang R. (2007). a study on the preventive effect of *lycium barbarum* polysaccharide on the development of alcoholic fatty liver in rats and its possible mechanisme, *Zhonghua Gan Zaug bing zazhi*, 15mar. (3):204-8.
- Guezlane- Tebibel N., Bouras N., Mokrane S., Benayad T., Mathieu F. (2013). Aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Annals of Microbiology*. 63: 295-305.
- Guezlane-tebibel Nadjat Bouras Nouredine, Ould el hadj Mohamed Didi. (2016). Les Mycotoxines: Un Danger De Santé Public. *Algerian journal of arid environment*. 6 (1): 32-49.
- Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Paris: Dunod., P: 7-330.

-H-

- Hall PA, Lane DP. (1997). Tumour suppressors :A developing role for p53 ?. *Curr Biol.* 7: R144-7.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 18(1):125-6.
- Hanak E , Boutrif E , Fabre P, Pineiro M. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO. Cédérom du CIRAD, Montpellier, France, (2002).
- Harborne JB. (1998). *Phytochemical Methods - A Guide to Modern techniques of plant analysis* Chapman and Hall, London, pp: 182-190.
- Harraz FM, Kassem FF. (1994). El-shaer. *A. J. Pharm. Sci.* 8(3): 219.
- Hatey A. (1977). Mechanisme of the in vitro inhibition of transcription by patuline, a mycotoxin from *Byssoschlamys nivea*. *FEBS Lett.* 74:121-125
- Hecht Y. (1991). *Les Maladies du foie et du tube digestif*, Lettres du monde, Paris.
- Hein KE, Tagliaferro AR et Bobilya DJ. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* .13: 572-584.
- Hélène K. (2013). Le bisphénol A : un suspect dans le cancer du sein ?. Bulletin de la Société des Enseignants Neuchâtelois de Sciences, n° 44.
- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH.(2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol.*;38 :1510-5.
- Herrman JL et Walker R. (1999). Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *Food Nutr Agr.* 23: 17- 24.
- Heywood J L, Manning R E, Vaske J J. (2002). Normative Research in Outdoor Recreation: Progress and Prospects for Continued Development and Applications. *Leisure Sciences.*24: 251-253.
- Hilaly JE, Israili ZH, Lyouss B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology.* 91: 43-50.

- Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ. (2005). Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed region spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.*43: 2092–103.
- Houshyarfard M, Rouhani H, Falahati-Rastegar M, Malekzadeh-Shafaroudi S, Mehdikhani E. (2014). Gene deletion patterns in non-aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus*. *Mycologia Iranica.* 1(2): 87 – 97.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ and Harris CC. (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Nature.* 350: 427–428
- Hua ST, Grosjean OK and Baker JL. (1999). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology.*29: 289–291.
- Huang D, Ou B, Prior RL. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.*53:1841-1856.
- Huang H, Potter CJ, Tao W, Li DM, Brogiolo W, Hafen E, Sun H, Xu T. (1999). PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development.*126(23):5365-72.
- Huffman JR, Gerber and L Du. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers.* 93(9): 764-76.
- Hussein HS et Brasel JM. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.* 167: 101-134.
- Huwig A, Freimund S, Kappeli O and Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different absorbents. *Toxicology Letters.* 122: 177-188.

-I-

- IARC (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 82: 1–556.
- IARC. (2002). Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. The International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Volume 82.
- image de contamination. <http://www.apsnet.org>
- Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L. (2001). Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet.* 357:1069-75.

Imge Oktay H, Dilek H, Emrah Y, Nevin G K. (2011). *Aspergillus flavus* primary causative agent of aflatoxins in dried figs. *Mycotaxon*. 115 : 425–433.

Inbaraj BS, Lu H, Kao TH, Chen BH. (2010). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* L innaeus by HPLC–DAD–ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51: 549–556.

-J-

Jaime-Garcia R, Cotty PJ. (2010). Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 1842-7.

Jermnak U, Yoshinari T, Sugiyama Y, Tsuyuki R, Nagasawa H, Sakuda S. (2012). Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. *Int J Food Microbiol*. 153(3):339-44.

Jurina-Romet M, Abbott FS, Tang W et al. (1996) Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamin C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology*. 112: 69–85.

-K-

Kakkar S and Bais S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *Pharmacology*. 2014:952943.

Karlovsky P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat Toxins*. 7: 1-23.

Karthikeyan M, Sandoskumar R, Mathiyazhagan S, Mohankumar M, Valluvaparidasan V, Kumar S, Velazhahan R. 2009. Genetic variability and aflatoxigenic potential of *Aspergillus flavus* isolates from maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(1) : 83–91.

Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*. 94: 550-557

- Kibge BS, Amadou A. (2015). Les aflatoxines et leurs effets sur l'intégrité du génome. *Bio Sya Journal Des Sciences De La Sante Et De Nutrition*. 3(1) : 1840-6963.
- Klein PJ, Van Vleet TR, Hall JO & Coulombe RA. (2002). Dietary Butylated Hydroxytoluene Protects against Aflatoxicosis in Turkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1):11-19
- Klich, MA. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 116 p.
- Koehler-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20: 165-177.
- Koller A., 1984, Total serum protein. *Clin Chem*. 418.
- Kordali S, Cakir A, Zengin H, Duru ME. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*.74: 164-167.
- Kouri G, Tsimogiannis D, Bardouki H et Oreopoulou V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging* 8: 155-162.
- Kpatinvoh B, Euloge S. A, Edwige D, Konfo T C, Brice A, Mohamed M S, Dominique C K S. (2017). Efficacité des huiles essentielles de trois plantes aromatiques contre la mycoflore d'altération du niébé (*Vigna unguiculata* L., Walp) collecté dans les magasins de vente du Sud-Bénin. *Journal of Applied Biosciences*. 109: 10680-10687.
- Krishnamachari KA, Bhat RV, Nakarajan V. (1975). Hepatitis due to aflatoxin. *Lancet*. 1: 1061-1063.
- Kumeda, Y., and T. Asao. (1996). Single-strand conformational polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol*. 62:2947-2952.
- L-
- Le Bars J, Le Bars P. (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs séquences. Conférence de la « Section Midi-Pyrénées ». Toulouse.

- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, et Lee CY. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*. 51: 7292-7295.
- Leyral G, Vierling E. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 3^{ème} Edition. DOIN, Paris, 15-20, p 268.
- Li X, Wang X, Chen D, Chen S. (2011). Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid in vitro. *Functional Foods in Health and Disease*.7: 232–244.
- Liao et Yin, Liao K, M. Yin. (2000). Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *J. Agric. Food Chem*. 48: 2266-2270.
- Liau KH, Blumgart LH and DeMatteo RP. (2004). Segment-oriented approach to liver resection. *Surgical Clinics of North America*. 84 : 543-561.
- Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ. (2007). Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *Int. J. Cancer*. 120 : 2306-16
- Liu CL, Wang JM, Chu CY, Cheng MT, Tseng TH. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 40(5):635–641.
- Liu KS, Tsao SM, Yin MC. (2005). *In vitro* antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research*.19 (11): 942–945.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265–75.
- Lu, CX. (1991) Radiosensitizing effects of *Lycium barbarum* polysaccharide of Lewis lung cancer. *Chung His I Choeh Ho Tsa Chih*. 11 (10): 611-612.
- Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A. (1998). Atlas de poche de pharmacologie, 2^{ème} édition. Paris : Médecine-Sciences, Flammarion, pp: 32-42.
- Luo Q, Cai YZ, Yan J, Sun M, Corke H. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sciences* : 76 (2):137–149.
- Luq QQ, Cia Y, Yun J, Sun M. (2004). Corke H.hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life sciences*.76:137-149.

- Magan N and Olsen M. (2004). *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing in food science and technology, pp 471.
- Maitre M. Etude d'une plante traditionnelle du Tibet : le goji, *Lycium barbarum* (Solanaceae). Thèse de doctorat en pharmacie, université de besnçon. (2011).
- Makun H A, Anjorin ST, Moronfoye B, Adejo FO, Afolabi OA, Fagbayibo G, Balogun BO and Surajudeen AA. (2010). Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria. *African Journal of Food Science*. 4(4) : 127-135.
- Manonmani HK, Anand S, Chandrashekar A, Rati ER. (2005). Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*. 40: 2859–2864.
- Marchall WJ, Bangert SK. (2004). *Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic*, 5^{ème} édition. Française. France : Elsevier., pp : 59-87.
- Marie A, Jean ML, Norman K, Marcel B, Michel L et Yves F. (2002). Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut National de Santé Publique Quebec. P : 3-19.
- Maristela M, Ariane MK, Tatiane PS, Carolina P, Geovana DS, Vildes MS. (2014). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. *African Journal of Biotechnology*. 13(1): 131-137.
- Marjorie MC. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev* .12(4):564–582.
- Markham, K.R. *Techniques of flavonoid identification*; Academic Press: New York, NY, USA, 1982; pp. 36-51.
- Martin J., Bâ A., Dimanche P., Schilling R. (1999). Comment lutter contre la contamination de l'arachide par les aflatoxines ? Expériences conduites au Sénégal. *Agriculture et développement*, 23 : 58-67.
- Martinez F, J Fitzgerald Kennedy. (2013). Les baies de Goji (*Lycium barbarum*) et (*Lycium chinense*) Éditions Perrin, pp 340.
- Martinez-Cayuella M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77:147-177
- Matkowski A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants--a review. *Biotechnol Adv*. 26(6):548-60.

- McLean M. and Dutton MF. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacol. Ther.* 65 (2):163-192.
- Mendoza L, Yañez K, Vivanco M, Melo R, Cotoras M. (2013). Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Ind. Crop Prod.* 43: 360–364.
- Michel T. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat en Chimie analytique. Phytochimie. Université d'Orléans. (2011).
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.* 85:231-237.
- Millan Jose Luis. (2005). Alkaline phosphatase structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large super family of enzymes. *Purinergic signaling.* 2:335-341.
- Mišan Aleksandra , Neda M, Mimica-Duki Anamarija I. Mandi Marijana B, Saka Ivan Lj, Milovanovi Ivana JS. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry.* 1: 133-142.
- Mishra PK, Shukla R, P Singh, Prakash B, Kedia A, Dubey NK. (2012). Antifungal, anti-aflatoxigenic, and antioxidant efficacy of Jamrosa essential oil for preservation of herbal raw materials. *International Biodeterioration & Biodegradation.*74: 11-16.
- Mocan A, Gökhan Z, Simirgiotis M, Schafberg M, Mollica A, Vodnar D C, Cri an G, Rohn S. (2017). Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 32:1, 153-168.
- Mocan A, Vlase L, Vodnar DC, Bischin C, Hanganu D, Gheldiu AM, Oprean R. (2014). Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L and *Lycium chinense* Mill leaves. *Molecules.* 19(7):10056-73.
- Mohammedi Z, Atik F (2013). Fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spore germination and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*. *Aust. J. Crop Sci.* 7(3):293-298.
- Molinié, A. Qualité sanitaire des blés en région Midi-Pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines de stockage (ochratoxine A et citrinine), Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. These, ENSAT-INP Toulouse, 2004.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın J. Sci. Technol* : 26, 211–219.

Moreau C, Lebas JM. (1995). La conservation des produits alimentaires par les HP : une réalité technologique et économique. IAA. 293-297

Morlot C, Zapun A, Dideberg O, and Vernet T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* 50 : 845-855.

Moss M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxins in foods tuffs International. *Biodeterioration and Biodegradation.* 50: 137-142.

Mshvildadze V, Favel A, Delmas F, Elias R, Faure R, Decanosidze Q, Kemertelidze E, Balansard G. (2000). Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie.* 55(4):325-326.

Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*;155: 335–350.

Multon JL. (1982). Conservation and stokage grains and seeds and derivatives products cereals, oilseeds, pulses, feed. Technique & Documentation. Lavoisier. Paris. Vol .1. pp : 576.

-N-

Nemmiche S, Chabane-Sari D. (2007). Guiraud, P. Role of -tocopherol in cadmiuminduced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chemico-Biological Interactions.*170: 221–230.

Neuzil J1, Stocker R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 331(3) :281-4.

Neveen HA, Deabes M, Lamia AE, Mona K. (2015). Chemical Composition and Antifungal Activity of *Ocimum basilicum* L. Essent. Oil Maced. *J. Med. Sci.* 3(3):374-379.

Newberne PM. (1974). Mycotoxins: Toxicity, carcinogenicity and the influence ofvarious nutritional conditions. *Environ. Helth. Perspect.* 9: 1-32.

Nguyen MT. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialise dans cinq provinces de la région centrale du vietnam-étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse. (2007).

-O-

Oliveira VM, Carraro E, Auler ME and Khalil NM. (2016). Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. *Braz. J. Biol.* 76(4):1029-1034

Organisation mondiale de la Santé. Traditional Medicine in the African Region. An Initial Situation Analysis (1998–1999). Harare, bureau régional de l’Afrique de l’OMS, 2000.

Ouattara Sourabie PB, Nikiema PA, Traoré AS. (2011). Characterization of strains of *Aspergillus* spp isolated from the seeds of peanuts grown in Burkina Faso, West Africa. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5: 1232-1249.

Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *Japanese Journal of Nutrition.* 44 : 307-315.

Ozkan, M. (2002). Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chem.* 78 (4): 499–504.

-P-

Pardo E, Marin S, Solsona A, Sanchis V, Ramos AJ. (2004). Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiol.* 21: 267– 274.

Park DL. (1993). Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Add contam,* 10: 49-60.

Paster N, Juven BJ, Harshemesh H. (1988). Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *J Appl Bacteriol.* 64(4):293

Paterson PJ, Seaton S, McLaughlin J, Kibbler CC. (2003). Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections. *J. Clin. Pathol.* 56 : 368-370.

Patterson DSP. (1976). Structure, metabolism and toxicity of the aflatoxms. *A Review Cah. Nutr. Diet.* 2 : 71-76.

Peers FG et Linsell CA. (1975). Aflatoxin : contamination and its heat stability in Indian cooking oils. *Trop Sci,* 17: 229-232.

Pfohl-Leskowicz A. (1999). Métabolisation des mycotoxines - Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. In « Les mycotoxines dans l’alimentation : évaluation et

- gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Technique et Documentation, Paris. pp : 18- 35.
- Pincemail J, Heusele C, Bonté F, Limet R et Defraigne JO. (2000). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int.* 4 : 158-165.
- Pitt JI and Miscamble BF. (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J Food Prot.* 58: 86-90.
- Pitt JI, Hocking AD. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3rd Ed., London: Springer Verlag.
- Plaa GL and Charbonneau M. (2001). Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury. *Methamphetamine Toxicity Journal.* 4: 1145-1187.
- Pohland AE, Neisheim S et Friedman L. (1992). Ochratoxin A, a review. *Pure Appl. Chem.* 64: 1029-1046.
- Potterat O et Matthias H. (2008). "Goji juice: a novel miraculous cure for longevity and wellbeing? A review of composition, pharmacology, health-related claims and benefits". *Schweiz. Zschr. Ganzheits Medizin.* 20: 31-405.
- Potterat, O. (2010). Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica:* 76(1): 7–19.
- Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra PK, Dubey NK. (2010). Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology.* 142 :114–119.
- Rastogi N, Legrand E, Sola C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.* 20(1):21-54.
- Rayner E, Dollear F. (1970). Removal of aflatoxins from oilseed meal by extraction with aqueous isopropanol *Journal of the American oil chemists Society, (CD/UPA, N°69034).* 47:26.

Reddy KRN, Reddy CS, Muralidharan K (2009). Efficacy of Certain Agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93 : 53–57.

Redouane-Salah Sara. Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé. Thèse doctorat. Option : Toxicologie. L'institut national polytechnique de Toulouse. (2016).

Riba A, Bouras N, Mokrane S, Lebrihi A, SabaouN. (2010). *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2772-2777.

Riba A., Sabaou N., Mathieu F. et Lebrihi A., (2005). Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.

Rotimi VO, Laughon BE, Barlet J S and Mosadomi H A. (1988). Activities of Nigerian Chewing sticks extracts against *Bacterioides gingivalis* and *Bacterioides melaninogenicus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 32(4): 598–600

Rouziere A. (1996). La technologie post- récolte de l'arachide : situation, diagnostic et propositions. Rapport de mission au Sénégal. Isra, Cirad, Coraf-réseau arachide. Cirad, Montpellier, France, pp72.

Rustom IYS. (1997). Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59: 57-67.

Saiki RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA *et al.* (1985). Enzymic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-4.

-S-

Sanchez-Hervas M, Gil JV, Bisbal F, Ramon D, Martinez-Culebras PV. 2008. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology* .125: 336–340.

Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int Pharm Sci*. 1:25–41.

- Sanmugapriya E, Venkataraman S. (2006). Studies of hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* L. seeds on CCl₄ induced acute hepatic injury in experimental rats. *J Ethnopharmacol* 105: 154-60
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30: 3875-3883.
- Schabereiter-Gurtner C, Brigitte S, Manfred L R, Alexander M H and Birgit W. (2007). Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 45(3): 906–914.
- Schofield P, Mbugua DM, Pell AN. (2001). Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 426–435.
- Sharamon S, Baginski, B J. (2009). La baie de goji-un fruit hors du commun au pouvoir antioxidant surpuissant, Paris : Edition Médicis pp 188.
- Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. (2013). Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*. 22:1063–1079.
- Sikkema JI, de Bont JA, Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*. 59(2): 201-22.
- Sirajudeen M, Kandasamy G, Jagbir ST, Ram PM, Jag M, Ram S. (2009). Protective effects of melatonin in reduction of oxidative damage and immunosuppression induced by aflatoxin B₁-contaminated diets in young chicks. *Environmental Toxicology*. 26(2): 153-160.
- Sofowora, A. (1993). Medical plants and traditional medicine in Africa. Spectrum books Ltd, Ibadan, Nigeria. pp.289.
- Soler L, Delingette H, Malandain G, Montagnat J, Ayache N, Koehl C. (2001). Fully automatic anatomical, pathological, and functional segmentation from CT scans for hepatic surgery. *Computer Aided Surgery*. 6: 131-142.
- Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol*. 327 (7) : 649-62.

Spichiger Redolphe-Edouard. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs (presses polytechnique et universitaire romandes, collection biologie. pp 413.

Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, *et al.* (2012). Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed-Focus on Europe. *Toxins*. 4 : 788-809.

Stuart GA, Smith FP. (1911). Chinese MateriaMedica. Shanghai. *American Presbyterian Mission Press*: 250.

Subramanian S, Stacey G and Yu O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci*. 12: 282-285.

Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem*. 46: 4267-4274.

Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res*. 243–268.

Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. (2003). Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian. Pac J. CancerP*. 4:319-26

Szaefer H, Cichocki M, Brauze D, Baer-Dubowska W. (2004). Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr. Cancer*. 48:70-7.

-T-

Tabuc C. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest. (2007).

Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Mori H. (1995). Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer*. 75: 1433-9.

Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M. (2011). Potential cancer Chemopreventive activity of protocatechuic acid. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 3(1):27-33.

Tekwu EM, Pieme AC and Beng VP. (2012). Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *J. Ethnopharmacol*.142:265–73.

- Terauchi M, Kanamori H, Nobuso M, Fukuda S, Yahara S, Yamasaki K (1998). Antimicrobial components in leaves of *Lycium chinense* Mill. *J. Food Hyg. Soc. Japan* .39(6): 399-405.
- Thierry S. (2000). Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur p53 *médecine/sciences*. 16 : 469-72.
- Thompson JS, et al. (1994) Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* 369(6477) :245-7
- Tian J1, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y. (2012). The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One*: 7 (1):e30147.
- Toffa DD. Étude de la contamination de certains aliments d'origine végétale de la République du Niger les moisissures toxigènes. Thèse de doctorat. Discipline : BiologieSpécialité : Mycologie-Environnement. Université Mohammed V Faculté Des Sciences Rabat. (2015).
- Torreggiani A, Trinchiro A, Tamba M, Taddei P. (2005). Raman and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of quercetin: Cu (II) chelation and oxidizing radical scavenging. *Journal Raman Spectroscopy*. 36(5): 380–388.
- Tozlovanu M. Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Ecole doctorale Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries Spécialité: Toxicologie et Sécurité des Aliments, Toulouse. (2008).
- Travis, S. S., Bethea, L. S., & Winn, P. (2000). Medication hassles reported by family caregivers of dependent elders. *Journals of Gerontology. Medical Sciences*.55 : 412–417.
- Trease GE and Evans WC. (1989). pharmacognosy, 11th Ed. Brailliantiridel Can., Macmillian Publisger. London. pp: 35-68
- Trease GE, Evans WC. (2002). Pharmacognosy. 15th Ed. Saunders Publishers: London. pp: 46-78.
- Treki AS, Merghem R et Dehimat L. (2009). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée : *Thymus hirtus*. *Sciences & Technologi*: 29: 25-29.

Tripathi P, Dubey NK. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology & Technology*. 32: 235-245.

Tseng TH, Hsu JD, Lo M H, Chu CY, Chou FP, Huang CL *et al.* (1998). Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters*. 126(2): 199–207.

Tsimogiannis D I, Oreopoulou, V. (2004). Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3,4-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5: 523–528.

Tung HT, Hamilton PB. (1973). Decrease plasma carotenoids during aflatoxicosis. *Poultry Science*. 52: 80-83.

-U-

Uchiyama M, Mihara M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 86: 271–8

Uehara T, Suefuji K, Valbuena N, Meehan B, Donegan M and Park JT. (2005). Recycling of the anhydro-N-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to N-acetylglucosamine-phosphate. *J. Bacteriol*. 187: 3643-3649.

Ul-Haq I., Idrees S., and Rajoka M. (2002). Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochem*. 37: 637-341.

Ultee A, Bennik MHJ and Moezelaar R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 68(4): 1561–1568.

-V-

Villar S, Ortiz-Cuaran S, Abedi-Ardekani B, et al (2012). Aflatoxin-induced *TP53 R249S* mutation in hepatocellular carcinoma in Thailand: association with tumors developing in the absence of liver cirrhosis. *PLoS One*, 7, 37707.

Vuorela, S. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Academic Dissertation. Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry. University of Helsinki. (2005).

-W-

Wagacha JM, Muthomi JW. (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 124(1):1-12.

Wang J, Hu Y, Wang D, Zhang F, Zhao X, Abula S, et al. (2010). *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast. *International Journal of Biological Macromolecules.* 46 (2): 212–216.

Whitlow LW, Hagler WM. (2013). Mycotoxin contamination of feedstuffs – an additional stress factor for Dairy cattle, 32pp.

Wild CP, Turner PC. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 17 :471–481.

Wilkinson HH, Ramaswamy A, Sim SC, Keller NP. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia.* 96(6): 1190–1198.

Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97: 705-711.

Wray, B.B. aflatoxins, hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *N. Engl J. Med,* 1982. 305-833.

Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52 (26): 7846-7856.

-X-

Xianwen L, Ruicen L, Chunqiang R, He Z, Chenglan L. (2015). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control.* 50: 401–404.

Xiaq J, Liong AC, Ching YP, Chan GRC, So KF, Fung ML, Tipoe GL. (2012). *Lycium barbarum* polysaccharides, protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and neutrophilic inflammation, *journal of Ethnopharmacology.* 139: 462-470.

-Y-

Yiannikouris A , Jouany JP. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales*. 15 (1): 3-16.

Young-Sun M, Leesun, Hyang Sook and Sung-Eun L. (2017). 4-Hydroxy-7-methyl-3-phenylcoumarin Suppresses Aflatoxin Biosynthesis via Downregulation of aflK Expressing Versicolorin B Synthase in *Aspergillus flavus*. *Molecules*. 22: 712.

-Z-

Zelko IN, Mariani TJ and Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Med. Biol*. 33: 337-349.

Zhao, R. (2005). Effect of Lycium barbarum polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi*. 125(12): 981-988.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 64 (4): 555-559.

Zinedine A. Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse De Doctorat Spécialité : Biologie, Option : Microbiologie. (2004).

1. (1)<http://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--El-Tarf--Ben-Mehidi--Berrihane>
2. . <http://plants.usda.gov/java/>

Annexes

Annexe 1.

Enquête ethnobotanique réalisé sur le *Lycium halimifolium* Mill auprès des tradipraticiens.

1. Quel est le nom local de *Lycium halimifolium* Mill ?
2. Quelles sont les maladies soignées par cette espèce ?
3. Quelle partie de cette plante est-elle utilisé dans les traitements des maladies (feuilles, fleurs, écorces de tronc ou racines ?
4. Comment prépare-t-on cette drogue ?
5. Vous utilisé seul ou associé avec d'autres plantes pour soigner ?

Annexe 2.

Les réactifs utilisés dans le screening des alcaloïdes

1. Réactif de Mayer

- Chlorure de mercure1,36 g
- Iodure distillée.....5 g
- Eau distillé.....100 mL

2. Réactif de Wagner

- Iodure de potassium2 g
- Iode1,27 g
- Eau distillé100 mL

3. Réactif de Dragen Droff

Solution A

- Nitrate de bismuth1,7 g
- Acide tartarique concentré5 g
- Eau distillée100 mL

Solution B

- Iodure de potassium10 g
- Eau distillée100 mL

Le mélange (A+B) est additionné à 10g de l'acide tartarique, puis dilué par l'ajout de 100ml de l'eau distillé.

Les réactifs utilisés dans le screening des Métabolites primaires

1. Réactif de Fehling

Solution A

- Sulfate de cuivre40g/l

Solution B

- Tartrate de sodium et de potassium..... 200g
- Hydroxyde de sodium.....150g , H₂O.....1L

Annexe 3.

2. Les Milieux de cultures.

2.1- Milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre200g

Saccharose20g

Agar15g

Eau distillée1000ml

Laver la pomme de terre non pelée;

- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée;
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min;
- D'autre part, faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée;
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar;
- Ajouter le glucose;
- Compléter le volume à 1000 ml;
- Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min.

2.2. La gélose Mueller-Hinton

infusion de viande de bœuf300 ml

peptone de caséine17,5 g

amidon de maïs1,5 g

agar17,0 g

pH est ajusté à 7,4.

2.3- Milieu potato dextrose broth (PDB)

D-glucose20 g

Extrait liquide de pomme de terre..... 1000 ml

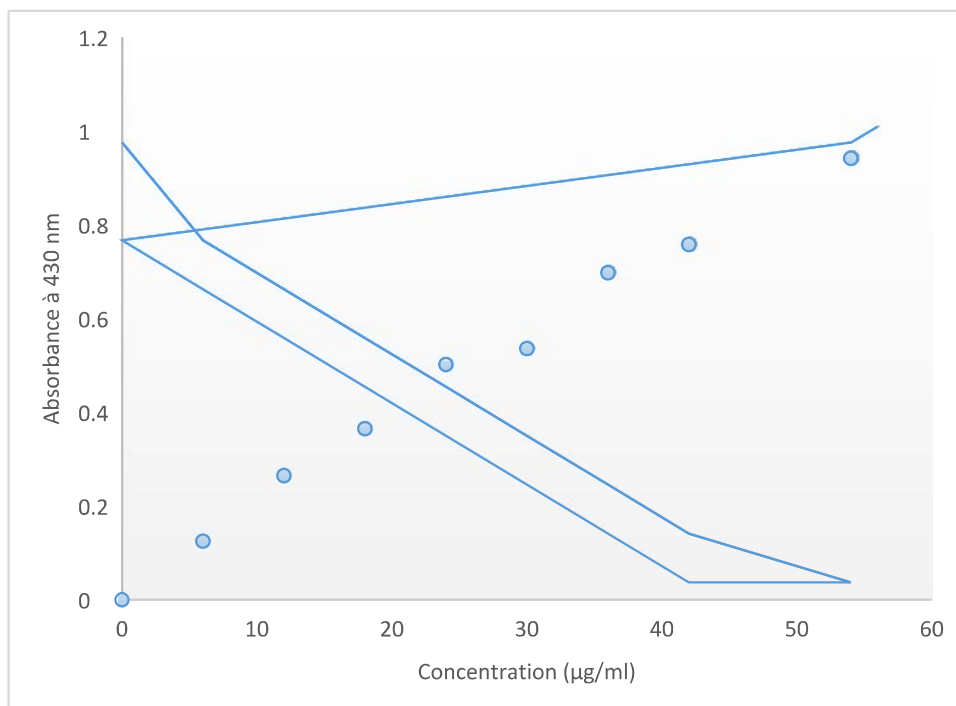
pH est ajusté à 5.1.

2.4- Milieu Yeast Extract Sucrose (YES)

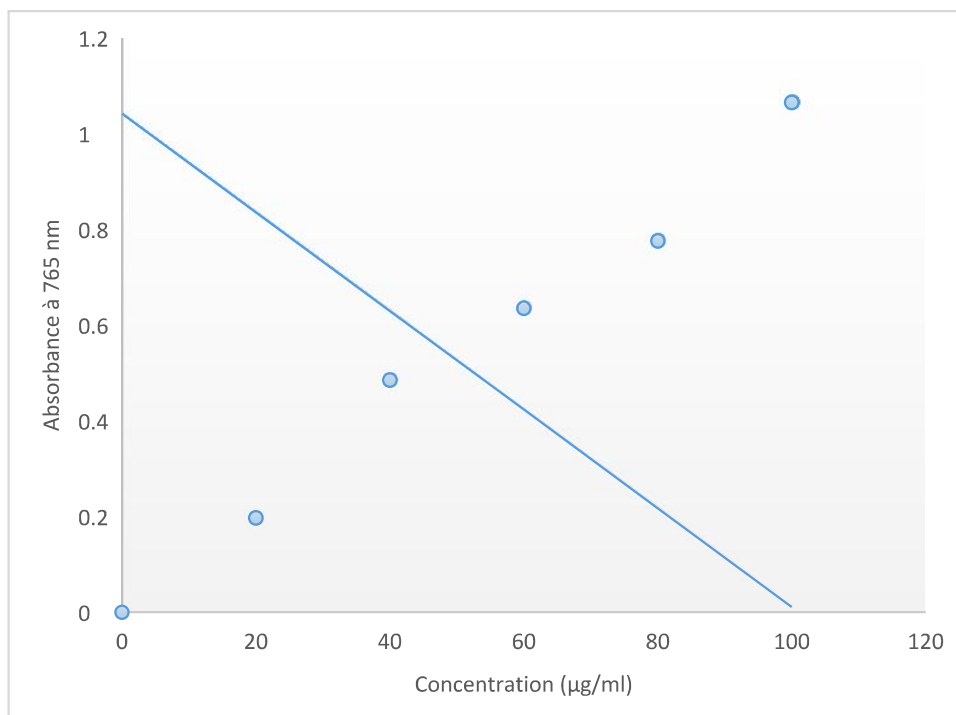
Extrait de levure	20g
Sucrose.....	150 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,005g
Eau distillé	1000ml

Annexes 4.

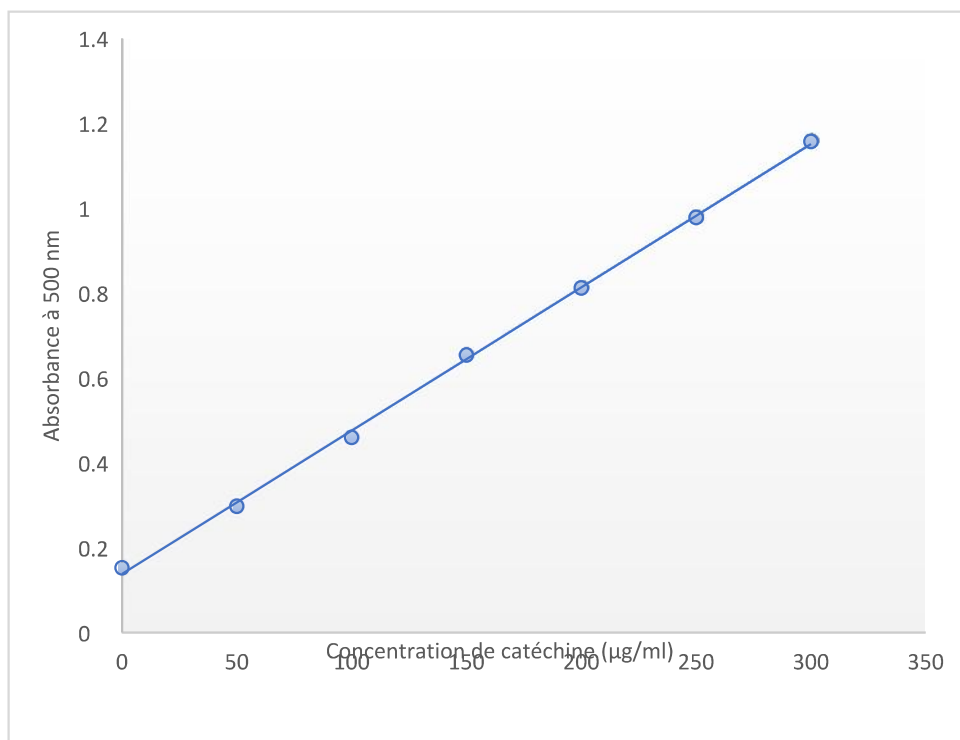
1. Les courbes d'étalonnages pour le dosage des PPT, FT, TC



Droite d'étalonnage de la quercétine

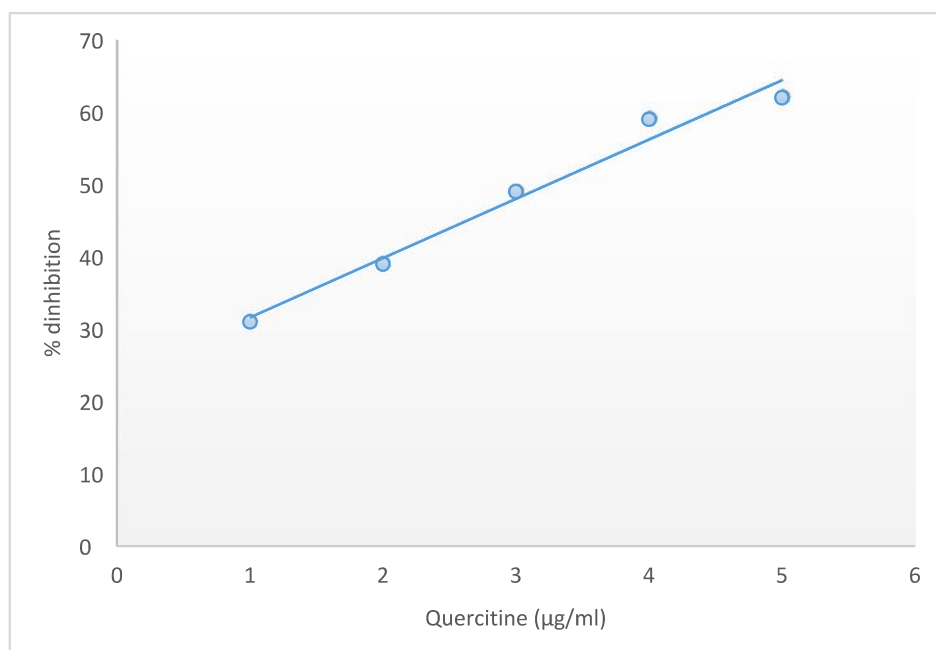


Droite d'étalonnage de l'acide gallique



Droite d'étalonnage de la catéchine

2. La courbe d'étalonnages de l'activité antioxydante



Activité antiradicalaire de la quercétine

Nom et prénom : MOSBAH Camélia

Date de soutenance 09/01/2018

Thème : Etude de l'effet antimycotoxinogène et antihépatotoxique des extraits d'une plante utilisée dans la thérapie traditionnelle.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude antimycotoxinogène et antihépatotoxique de deux extraits de feuilles de la plante *Lycium halimifolium* Mill.

Deux isolats fongiques ont été obtenus à partir des grains d'arachides, et un seul isolat qui présente des caractéristiques du genre *Aspergillus* a été sélectionné. L'identification moléculaire a confirmé que l'isolat sélectionné est un *Aspergillus flavus*, avec une similarité de 99%, enregistré sous le code d'accèsion (gi | 146746162 | EF409803.1), cette souche a servi pour l'étude des effets précédemment cités. L'évaluation préliminaire de la composition des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs groupes chimiques en l'occurrence, les flavonoïdes, alcaloïdes, les terpènes, les saponosides. Cette évaluation a été confirmée par une analyse quantitative. Les résultats obtenus ont montré que, les deux fractions ACT et BUT des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill ont présenté des teneurs considérables en polyphénols estimés à 61.66 ± 0.042 et 60.21 ± 0.102 μg EAG/mg PS, respectivement et celles des flavonoïdes ont montré aussi des valeurs intéressantes estimées à 25.18 ± 0.014 pour ACT et 17.79 ± 0.015 μg EQ/mg PS pour BUT. En revanche, des teneurs faibles en tannins ont été obtenus et estimés à 5.872 ± 0.053 (ACT) et 7.058 ± 0.013 μg EC/mg PS (BUT). L'identification chromatographique de la fraction ACT a permis de caractériser quatre acides phénoliques: l'acide protocatechique (19.29%), l'acide gallique (0.499%), l'acide coumarique (0.386%), l'acide syringique (0.142%) et un flavonoïde (la rutine) (12.58 %). Alors que la fraction BUT contient trois acides phénoliques : l'acide protocatechique (20.32%), l'acide syringique (0.236%), et l'acide coumarique (0.124%), et un flavonoïde (la rutine) (2.098 %). Il a été signalé que le présent travail a permis pour la première fois de mettre en évidence la présence l'acide protocatechique, l'acide gallique et l'acide syringique dans les feuilles de *Lycium halimifolium* Mill. L'étude de l'activité antifongique, a permis d'estimer la CMI et CFS de la fraction BUT à 312 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et de 625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour la fraction ACT. L'activité antimycotoxinogène de *Lycium halimifolium* Mill a révélé une inhibition de la sécrétion de l'aflatoxine B1 par la fraction BUT estimée à 96,83%, et un pourcentage d'inhibition de 94,99% a été trouvé par la fraction ACT. Cette inhibition a été en corrélation avec le pourcentage de la réduction de biomasse mycélienne dont le taux d'inhibition de biomasse est de $56.53 \pm 2.74\%$ en présence de la fraction ACT et de 65.22 ± 0.10 % en présence de la fraction BUT. L'évaluation de l'activité antioxydante des deux fractions a montré que la fraction BUT était plus active que la fraction ACT. L'activité antibactérienne a révélé que la fraction BUT a un effet positif vis-à-vis *E. coli* et *S. aureus*.

Enfin, l'étude de l'effet antihépatotoxique des deux fractions des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill, a montré que les souris traitées par ACT et BUT ont connus une normalisation des taux de TGO, TGP, PAL en comparaison avec le témoin, ainsi que la standardisation des paramètres du stress oxydatif. L'étude histologique a montré que les deux fractions préservent les hépatocytes contre les lésions oxydantes, et jouent donc un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydatif contre les modifications histopathologiques produites par l'aflatoxine B1. En conclusion, ce travail est le premier à avoir démontré l'activité antimycotoxinogène et antihépatotoxique des feuilles de *Lycium halimifolium* Mill.

Mots clés : *Lycium halimifolium* Mill, *Aspergillus flavus*, Aflatoxine B1, Antimycotoxinogène, Antihépatotoxique.

Président de jury :	HAMIDECHI A.	Prof	Univ. Constantine.
Directeur de thèse :	KACEM CHAOUCHE N.	Prof.	Univ. Constantine.
Examineurs :	RIBA A.	Prof	Univ. Boumerdes.
	DEHIMAT L.	Prof	Univ. Constantine.
	BOULAKHSAIM M.	Prof	Univ. Oum El Bouaghi.
	KHANNOUF S.	Prof	Univ. Setif.

2017-2018