

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
FACULTE DU SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

Présenté par : BELABBAS Nabila et KOUIDRI Saida

Thème

***Etude de l'activité antifongique des extraits aqueux « froid » et « chaud »
de poivre noir sur quelques moisissures contaminants le blé dur stocké.***

Soutenu publiquement le : 27/ 06 /2018

Devant le jury:

Présidente : M^{me} OULD EL HADJ-KHELIL Aminata

Pr

U.K.M.Ouargla

Examinatrice : M^{elle} HADJADJ Soumia

M.C.B

U.K.M.Ouargla

Encadreur : M^{me} DJARBAOUI Amina Nesrine

M.A.A

U.K.M.Ouargla

Année universitaire : 2017/2018

Remerciement

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes profondes reconnaissances et à remercier :

Mme DJARBAOUI Amina Nesrine Maitre-Assistant « A » au Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université d'Ouargla, pour avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer, pour ses conseils et pour ses orientations.

Mme OUELD EL HADJ-KHELIL Aminata, Professeur au Département des Sciences Biologique Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Ouargla, pour avoir accepté de présider ce jury.

Mlle HADJADJ Soumia, Maître de Conférences « B » au Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Ouargla, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Sans oublier Melle SALHI Nesrine, Maîtres de Conférences « A » et Mr CHAABANA Maitre-Assistant « A » au Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Ouargla, pour leurs conseils et leurs aides.

En fin Nous remercierions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, sans oublier les amies et tous les membres des laboratoires pédagogiques, les équipe du laboratoire bioressource et les étudiants de la promotion Biotechnologie Végétale 2017/ 2018.

Merci

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers particulières parents **Ma chère mère, Mon tendre père** qui ont sacrifié les plus belles années de leur vie pour me voir un jour réussir et pour leur soutien morale et l'encouragement durant toute ma vie et au moment particulier du projet A mes biens aimés grand-mère et grands-pères.*

A mes frères « Mohammed lakhdar, Harzallah, Mohammed alamine, Abd elhak, Yahia »

A mes sœurs « Afaf, Amina, Khadidja »

Mes neveu « Abdelkader, Mohammed Isehak »

A tous mes oncles et à toutes mes tantes.

A mes deux familles Belabbas et Benfardgallah.

Je dédie spécialement à mon binôme « Saida » pour l'aide à mon travail.

A tous les étudiants de la promotion : Master 2017-2018 Biotechnologie végétales du département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et. Université Kasdi Merbah Ouargla.

A l'ensemble des amis que j'ai connu pendant mes études et à ceux qui m'ont prodigué leurs vifs conseils, encouragements et témoigné de leur amitié et à toutes mes AMIES.

NABILA



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à **ma mère**.*

*A la mémoire de **mon père**, l'école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de sa vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

A mes chers frères : Abdeslam, Abdelkrim, Noureddine, Mohammed Amine.

A mes chères sœurs : Soumaya, Marwa, Fatima, Yamina, Habiba et Amel.

A mes neveux et nièces : «Hana, Anouar, Ahmed Yacine, Israa, Diyaa, Loudjine, Djawad, Bouchra, Ahmed Bachir, Ghofrane, Mohammed Iyad et Messaoud »

*A tous mes oncles et à mes tantes et ses enfants
A tout ma famille Kouidri*

A ma binôme Nabila qui a fait son travail par excellence.

*Je dédie également à tous mes amies surtout « **Abir et Leila** »*

A tous mes amies à l'Université Kasdi Merbah et dans la cité

MOHAMED AT-TAHER LABIDI

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

SAIDA.

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
<i>A.niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A.terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>A.ochraceus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
CDA	Czapek sucrose agar
CYA	Czapek yeast Agar
CZ	Czapek concentré
Eq	Extrait aqueux
G25N	Glycérol nitrate agar
MEA	Malt extract agar
mS/ cm	Milli Siemens/ centimeter
PDA	Potatoes dextrose agar
R	Répétition
TG	Taux d'inhibition de germination de spore
TI	Taux d'inhibition
TS	Taux d'inhibition de production de spore
VC	Vitesse de croissance
YES	Yeast extract sucrose

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre de tableau	Page
01	Les caractères physiques des extraits aqueux froid et chaud de <i>Piper nigrum</i> .	25
02	Teste phytochimiques des extraits aqueux froid et chaud de <i>Piper nigrum</i>	26
03	Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur les souches testées	27
04	Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur les souches testées	35

Liste des photos

Photo	Titre de photo	Page
01	Grains de <i>Piper nigrum</i>	13

Liste des figures

N° Figure	Titre de figure	Page
01	Structure histologique du grain de blé à maturité.	05
02	<i>Piper nigrum</i> ; A - Aspect de la plante ; B- baies vertes ; C- Fruits noirs, blancs et verts ; D- Grain de poivre	10
03	Etapas de La préparation d'extrait aqueux froid et chaud de <i>Piper nigrum</i> .	15
04	Préparation des différentes concentrations des extraits aqueux	19
05	Protocole expérimentale des différentes concentrations des extraits aqueux de <i>poivre noir</i> . (Asp n : <i>Aspergillus niger</i> ; Asp o : <i>Aspergillus ochraceus</i> ; Asp t : <i>Aspergillus terreus</i>)	20
06	Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction du temps et concentration d'extrait aqueux	29
07	Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux froid de <i>piper nigrum</i> .	30
08	Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux froid de <i>Piper nigrum</i>	31
09	Taux d'inhibition en fonction de la concentration d'extraits aqueux froid de <i>Piper nigrum</i> .	32
10	Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.	33
11	Inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.	34
12	Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction de temps et concentration d'extrait aqueux chaud de <i>piper nigrum</i> .	36
13	Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux chaud de <i>piper nigrum</i>	37
14	Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux chaud de <i>Piper nigrum</i> .	38

15	Taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud	39
16	Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration	40
17	Inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration	41

Liste des annexes

Annexe	Titre	Page
I	Les souches fongiques testées	51
II	Filtration de l'extrait par micro filtre	51
III	Les flacons des extraits aqueux chaud et froid	52
I	Tests phytochimiques	53
II	Inhibition de la sporulation	54

Table des matières

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

Liste des annexes

Résumés

Page

Introduction

01

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur le blé dur

03

I.1.1.Le blé

03

I.1.2.Importance alimentaire

03

I.1.3.Origine et diversité du blé dur en Algérie

03

I.1.4. Classification du blé dur

04

I.1.5. Structure du grain de blé dur

04

a. Grain de blé

04

b. Structure du grain de blé

05

b1. Les enveloppes et la couche à aleurone

05

b2. Le germe

05

b3. L'albumen

05

I.1.6. Stockage du blé dur

06

I.1.6.1. Le stockage dans des silos souterrains « Matmoura »	07
I.1.6.2. Stockage en sac	07
I.1.6.3. Stockage en vrac (courte durée)	07
I.1.6.4. L'entreposage en silo (longue durée)	08
I.1.7. Facteurs d'altération de blé dur stocké	08
I.1.7.1. Altération par les moisissures	08
I.1.7.2. Mycètes de champ	09
I.1.7.3. Mycètes de stockage	09
I.1.8. Utilisations des conservateurs chimiques	09
I.2. Généralité sur le poivre noir (<i>Piper nigrum</i>)	10
I.2.1. Description botanique	10
I.2.2. Répartition géographique	10
I.2.3. Classification	11
I.2.4. Composition générale du <i>Piper nigrum</i>	11
I.2.5. Composition biochimique	12
I.2.6. Domaines d'utilisation	12
<i>Chapitre II : Matériels et méthodes</i>	
II.1. Matériel végétal	13
II.1.1. Poivre noir « <i>Piper nigrum</i> »	13
II. 2. Matériel fongique	13
II.3. Préparation des extraits aqueux	13
II.3.1. Séchage	14
II.3.2. Broyage	14

II.3.3. Préparation de l'extrait aqueux froid	14
II.3.4. Préparation de l'extrait aqueux chaud	14
II.3.5. Analyses physiques d'extrait aqueux	15
a. Mesure du pH	15
b. Mesure du conductivité électrique	15
c. Indice de réfraction	15
II.3.6. Détermination du rendement des extraits secs	16
II.4. Tests phytochimiques des extraits aqueux	16
II.4.1. Détection des polyphénols	16
a. Détection des tanins	16
b. Détection des coumarines	16
c. Détection des anthocyanes	17
d. Détection des flavonoïdes	17
e. Détection des anthraquinones	17
f. Détection des saponosides	17
II.4.2. Détection des terpènes	17
a. Détection des stéroïdes	17
II.4.3. Détection des alcaloïdes	17
II.5. Essais d'activité antifongique des extraits aqueux	18
II.5.1. Activation des souches	18
II.5.2. Préparation des suspensions sporales	18
II.5.3. Souches fongiques testées	18
II.5.4. Préparation des différentes concentrations des extraits aqueux chaud et froid	18

II.5.5. La méthode de contact direct	21
II.6. Expression des résultats des tests antifongiques	21
II.6.1. Croissance radiale	21
a. Cinétique de la croissance mycélienne	21
b. Croissance mycélienne	21
c. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC)	22
d. Taux d'inhibition (TI%)	22
II.6.2. Test production de spore	23
II.6.3. Test germination de spore	23
II.7. Analyse statistique	24
<i>Chapitre III : Résultats et discussion</i>	
III.1. Résultats	25
III.1.1. Caractères physique	25
III.1.2. Tests phytochimiques	25
III.2. Activité Antifongique.	27
III.2.1. Activité antifongique des extraits aqueux.	27
III.2.1.1. Extrait aqueux froid.	27
a. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur les souches testées	27
b. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur la cinétique de croissance mycélienne.	28
c. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur la croissance mycélienne	30
d. Vitesse de croissance mycélienne	31
e. Effet antifongique d'extrait aqueux froid sur les souches testées.	32

f. Production de spore (T S)	33
g. Germination de spore (TG)	34
III.2.1.2.Extrait aqueux chaud	35
a. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur les souches testées	35
b. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur la cinétique de croissance mycélienne	36
c. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur a croissance mycélienne	37
d. Vitesse de croissance mycélienne	38
e. Effet antifongique d'extrait aqueux chaud sur les souches fongiques testées	39
f. Production de spore (T S)	40
g. Germination de spore (TG) D'extrait aqueux chaud	41
III.3.Discussion	42
Conclusion	44
Références bibliographiques	46
Annexes	51

Introduction

Les céréales sont des plantes cultivées principalement pour leurs grains. La production céréalière présente une partie importante de l'économie mondiale du fait qu'elle constitue la base de l'alimentation humaine et animale. Les céréales constituent en raison de leur importance un produit de transformation technologique important et un milieu favorable à la croissance des micro-organismes (**Khelifi, 2013**).

Parmi ces céréales, le blé qui occupe la première place pour la production mondiale et la deuxième après le riz, comme source de nourriture pour les populations humaines, et qui assure 15% de ses besoins énergétiques (**Bajji, 1999**).

Malheureusement, les céréales peuvent être contaminées par nombreux pathogènes fongiques, tel que *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Fusarium* ; l'origine de cette contamination est difficile de préciser (champ, transport, lieu de stockage...) (**Benouaer, 2016**).

Selon **Molinie, Pfohl-leszkowicz (2005)**, l'origine est mal connue, mais les spores disséminées par l'air peuvent provenir du champ ou de la poussière présente dans les infrastructures de stockage.

L'utilisation intensive de produits agrochimiques, en particulier de fongicides dans le contrôle des champignons à base de graines, ont été fortement critiqués pour les risques de la santé associés à leur utilisation (**Osman et al., 2003**).

Il est devenu très indispensable la recherche de nouvelles molécules en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antioxydantes et antifongiques pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques. Ces substances naturelles figurent les extraits des plantes aromatiques qui possèdent des extraordinaires vertus thérapeutiques et de leurs huiles essentielles dont les domaines d'application sont très variés et qui sont très utilisées dans l'industrie alimentaire comme additifs, et dans les cosmétique, les parfumeries, les industries de savon et de détergents en volume impressionnant (**Goumni et Salhi, 2013**).

Un grand nombre de plantes aromatiques, médicinales, des épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvant des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture (**Mohamedi, 2005**).

Les épices sont classées parmi les plantes médicinales, ces épices sont des parties de plantes aromatiques à la saveur forte. Ces épices renferment de nombreux principes actifs qui sont largement utilisés en thérapie, comme des agents préventifs antioxydants, antimicrobien, anti-inflammatoire...etc. (Shiva Rani et al., 2013).

L'utilisation des substances naturelles dans la lutte contre les moisissures des céréales stockées est à l'origine du choix de notre thème qui consiste en l'extraction de quelques métabolites secondaires de poivre noir et la recherche de leurs effets antifongiques sur des souches fongiques potentiellement toxigène isolées et identifiées à partir du blé dur stocké.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail à savoir l'étude de poivre noir « *Piper nigrum* » et d'estimer la teneur de cette espèce végétale en composés actifs essentiels, et d'en évaluer le pouvoir antifongique *in vitro*.

Pour se faire nous avons divisé notre mémoire en trois chapitres ; le premier chapitre représente une synthèse bibliographique qui portera sur le blé dur et les éventuelles moisissures toxiques pouvant se développer lors de son stockage et une étude sur l'épice poivre noir et ses activités biologiques, le deuxième chapitre concerne l'expérimentation, les matériels et les méthodes où nous établirons les différents protocoles nécessaire à l'extraction de notre plante et l'étude de leur activité antifongique, et le dernier chapitre illustre les résultats obtenus et leurs discussions. Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et perspectives.



Chapitre I :
Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur le blé

I.1.1. Le blé

Le blé, constitue une des céréales les plus cultivées dans le monde. C'est une source importante de protéine pour l'alimentation humaine. En Algérie, les produits céréaliers, dont le blé, occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cependant, la conservation post-récolte est le seul moyen d'assurer le lien entre la récolte intervenant une fois dans l'année et la consommation qui est permanente et obligatoire. **(Djermoun, 2009).**

Historiquement, le blé est l'une des trois céréales les plus cultivées dans le monde, les deux autres étant le maïs et le riz. Du point de vue quantitatif, c'est une céréale cultivée avec plus de 600 millions de tonnes par an. Les deux principales espèces actuellement cultivées sont le blé commun ou blé tendre, riche en amidon, cultivé un peu partout dans les régions tempérées et le blé dur, riche en amidon et en gluten, cultivé dans des zones plus chaudes et plus sèches. **(Djermoun, 2009).**

I.1.2. Importance alimentaire

Les blés constituent la première ressource alimentaire de l'humanité, et la principale source de protéines. Ils fournissent également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et de multiples applications industrielles. La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréalières **(Bonjean et Picard, 1991).**

I.1.3. Origine et diversité du blé dur en Algérie

L'origine du blé dur est un hybride, résultant du croisement aléatoire et naturel de l'espèce *Triticum monococcum* (sauvage) et une herbe spontanée apparentée au blé nommée *Aegilops speltoides*, toutes deux vraisemblables, puisqu'on les rencontre dans la même aire géographique **(Belaid, 1996).**

Les blés cultivés en Algérie appartiennent pour la presque totalité aux espèces *T. aestivum* L. (*blé tendre*) et *T. durum* Desf. (Blé dur). A l'intérieur de chaque espèce on trouve de nombreuses variétés botaniques. En effet, la diversité des blés algériens a été à l'origine, étudiée à partir des caractères morphologiques. D'autres paramètres tels que la taille, la forme de l'épi, la

position des barbes ont été pris en considération afin de distinguer ainsi un grand nombre de populations (**Erroux, 1949**).

I.1.4. Classification du blé dur

Le blé dur est une plante annuelle, monocotylédone, appartenant à la famille des *Poaceae*. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) (**Feillet, 2000**). Un premier croisement accidentel survenu il y a 10 000 ans, entre un blé sauvage (*Triticum monococcum*) et une herbe sauvage (*Aegilops speltoides*) a donné naissance à un blé dur (*Triticum durum*) (**Ouanzar, 2012**).

La classification du blé dur selon **Brouillet et al., (2006)** est la suivante :

Régne : Plantae

Sous-régne : Tracheobinota

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Ordre : Cyperales

Famille : Poaceae

Sous-famille : Pooideae

Genre : *Triticum*

Espèce : *Triticum durum*.

I.1.5. Structure du grain de blé dur

a. Grain de blé

Le grain de blé se présente sous la forme d'un corps ovoïde dont les deux extrémités sont inégales, et qui offre sur l'une de ses faces un sillon. Sur la face dorsale de l'une des extrémités se trouve une légère dépression. Les membranes qui recouvrent le grain en ce point sont plus fines, plus blanches et plissées. Cette dépression, qui est plus ou moins étendue suivant les variétés de blé, correspond à l'embryon. A l'autre extrémité du grain se trouvent des poils plus ou moins nombreux et plus ou moins longs. Ces poils constituent la brosse (**Dechambre, 1874**).

b. Structure du grain de blé

Le grain de blé (figure 01) est formé de trois parties distinctes : les enveloppes, l'albumen, et le germe (Smith et Hui, 2004).

b1. Les enveloppes et la couche à aleurone

Les enveloppes sont constituées de quatre tissus : le péricarpe externe, le péricarpe interne, la testa et la couche nucellaire ou bande hyaline (qui correspond à l'épiderme du nucelle). Ces enveloppes et la couche à aleurone sont composées principalement de polysaccharides (arabinoxylanes, xyloglucanes et cellulose) mais aussi d'acides phénoliques lignines et de protéines (principalement albumines globulines localisées dans la couche à aleurone. (Surget et Barron, 2005).

b2. Le germe

Le germe provient de la fusion des gamètes mâles et femelles. Il est constitué d'une part, de l'axe embryonnaire qui donnera la tigelle, la mésocotyle et la radicule et d'autre part du scutellum qui donnera le cotylédon. Le germe est la partie du grain où le taux d'humidité et la concentration en lipides sont les plus importantes. Les protéines dans le germe sont des albumines et globulines et représentent environ 35% de la matière sèche. (Surget et Barron, 2005).

b3. L'albumen

L'albumen constitue le plus important compartiment du grain et représente environ 80% de son poids. Il correspond au tissu de réserve. L'albumen amylicé est essentiellement constitué des granules d'amidon enchâssés dans une matrice protéique composée en grande partie de prolamines (gliadines, gluténines de hauts et faibles poids moléculaires) mais aussi d'albumines et de globulines. (Debiton, 2010).

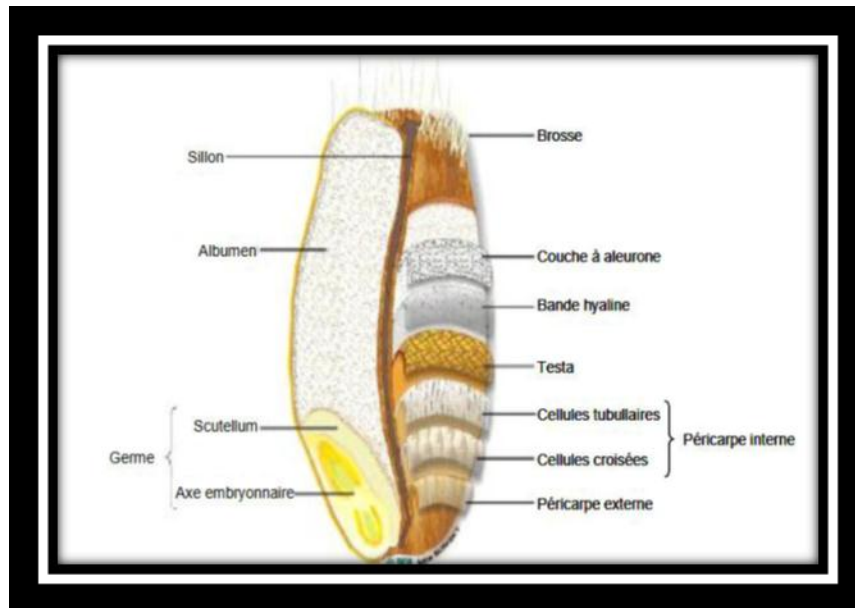


Figure 01 : Structure histologique du grain de blé à maturité (Debiton, 2010)

I.1.6. Stockage du blé dur

Le stockage des céréales durant plusieurs mois est une pratique courante. Sa nécessité vient du décalage entre leurs productions saisonnières et leurs utilisations par la meunerie tout au long de l'année. D'autre part pour régulariser le marché en fonction des récoltes, les pays producteurs conservent des stocks plus longtemps. Le stockage de ces blés est assuré principalement par les collecteurs agréés mais aussi par les meuniers, les stockeurs intermédiaires et les exportateurs. En fin, certaines quantités des céréales peuvent être conservées plusieurs années pour des raisons stratégiques. (Aidani,2015).

Si l'on destine le blé à l'alimentation humaine, il importe assez peu que le grain ait perdu de son pouvoir germinatif, mais il faut éviter qu'il ait subi tout début de germination même imperceptible, Des essais de stockage de longue durée 10 à 15 ans ont été réalisés pour préciser les conditions nécessaires à la bonne conservation des qualités meunières et boulangeries surtout dans le cas du blé. Les conditions d'entreposages sont importantes car si les grains de blé sont

stockés dans de mauvaises conditions, il y a un risque de germination et de prolifération des moisissures. La teneur en eau des grains la plus favorable pour l'entreposage est de 10 à 15%.

Afin d'obtenir un taux d'humidité correcte, il est parfois nécessaire que les graines de blé subissent un séchage par ventilation d'air chaude. Mais la température à laquelle s'effectue ce séchage ne doit pas dépasser 65°C, sinon il y a un début d'altération des protéines du gluten et de destruction des enzymes nécessaires pour la panification. (Aidani, 2015).

I.1.6.1. Le stockage dans des silos souterrains « Matmoura »

Le paysan Algérien, sur les hauts plateaux, conservait tant bien que mal, le produit de ces champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées de simple trous cylindriques ou rectangulaires construites dans des zones sèches, en sol stable, généralement argileux où le niveau de la nappe phréatique est suffisamment bas, c'est ce que l'on appelle (El Matmoura) à un endroit surveillé ou proche de la ferme, la capacité de ces lieux de stockage est variable, elle est de l'ordre de quelques mètres cubes, c'est une technique archaïque peut être encore utilisée dans certaines régions isolées (Doumaïndji et al., 2003).

I.1.6.2. Stockage en sac

Les grains sont conservés dans des sacs fabriqués en toile de jute ou en polypropylène pour les semences. Les sacs sont entreposés en tas dans divers locaux, magasins ou hangars. Souvent ce type de stockage est provisoire. Dans le cas de forte production et de saturation des divers locaux de grande capacité, l'utilisation des sacs et locaux annexes (hangars et magasins) devient nécessaire (Doumaïndji et al., 2003).

I.1.6.3. Stockage en vrac (courte durée)

Dans ce cas les grains en tas sont laissés à l'air libre dans des hangars ouverts à charpente métallique. Malheureusement les contaminations sont possibles ; d'autant plus que dans ce type de construction. Ils demeurent toujours des espaces entre les murs et le toit, ainsi le libre passage des souris, des rats, des moineaux des pigeons et des insectes demeure possible. Par ailleurs l'influence des intempéries est encore assez forte et le développement des moisissures et des bactéries est toujours à craindre (Doumaïndji et al., 2003).

I.1.6.4. L'entreposage en silo (longue durée)

Les silos sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal. Elles sont fermées à leur partie supérieure par un plancher sur lequel sont installés les appareils de remplissage des cellules. L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'air de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux (**Doumaindji et al., 2003**).

I.1.7. Facteurs d'altération de blé dur stocké

I.1.7.1. Altération par les moisissures

Le stockage des céréales pose de nombreux problèmes de conservation quant à la préservation de la qualité nutritionnelle, sanitaire et germinative des grains. Parmi les microorganismes qui attaquent les céréales au cours de leur stockage les moisissures qui sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif « le thalle », est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée. Les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques car ils sont non photosynthétiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques, les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (**Multon, 1982**).

Les grains de céréale forment un excellent milieu de culture pour les moisissures (**Mills, 1990**). Les moisissures constituent la cause essentielle des altérations d'origine microbienne dans les graines stockées, provoquant le brunissement et la mort des embryons. Les moisissures ont une activité lipolytique souvent importante et entraînent une augmentation de l'acidité. Les espèces prédominantes dépendent de l'importance de la contamination initiale, de la composition chimique du grain et de la température des stocks (**Boudreau et Ménard, 1992**).

Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, assurée par une infection des mycètes, des insectes et des acariens. Cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (**Mills, 1990**).

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Plusieurs sortes de mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires (Miller et Trenholm, 1994).

I.1.7.2. Mycètes de champ

Les céréales sont contaminées par des espèces rassemblant les moisissures qui s'implantent sur le grain avant la récolte. La plupart de ces espèces appartenant notamment aux genres *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Trichoderma*, ...etc. Beaucoup de ces champignons sont fortement cellulotiques, provoquant certaines maladies telle que la fusariose provoquée par le *Fusarium* (Akinsanmi et al., 2004).

I.1.7.3. Mycètes de stockage

Les facteurs environnementaux peuvent exercer une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques espèces mycotoxigéniques (Magan et al., 2003).

Au cours du stockage en silo, se développe une flore composée de champignons moins cellulotiques et plus osmophiles, éliminant peu à peu les champignons du champ et provoquant une acidification du substrat ; ce sont essentiellement des *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*), des *Eurotiums* (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens*) et des *Penicilliums* (*P. cyclopium*, *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. stoloniferum*) ainsi que *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus*. L'évolution de cette charge fongique s'est révélée proportionnelle à la teneur en eau et donc à l'activité de l'eau (I^{Aw}) (Larpen, 1990).

I.1.8. Utilisation des conservateurs chimiques

La lutte chimique contre les champignons phytopathogènes : les fongicides plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, de façon directe ou indirecte. En effet, certains fongicides agissent sur le système énergétique des cellules fongiques en inhibant les processus respiratoires. D'autres agissent sur la synthèse des constituants du champignon. Des substances ont encore pour but de désorganiser les cellules et leurs divisions au sein des tissus fongiques. Un classement de ces matières actives consiste à distinguer plusieurs catégories suivant leur pénétration dans la plante et leur fonction chimique (Rocher, 2004).

I.2. Généralité sur le Poivre noir (*Piper nigrum*)

I.2.1. Description botanique

Le poivre noir est une plante vivace, assez épaisse et ligneuse qui rampe sur le sol ou grimpe quand elle rencontre un support (tuteur, arbre). Elle peut atteindre 8 à 10 mètres de long (Baker, 2008). Les racines pénètrent en terre lorsqu'elles reposent sur le sol ou se transforment en griffes quand elles s'appuient sur un tuteur. Les feuilles en forme d'as de pique sont simples, ovales et vert foncé. Ses fleurs sont petites, disposées en épis allongés, cylindriques, serrés et pendants. L'inflorescence peut contenir plus de 150 petites fleurs de couleur blanc jaunâtre. Les fruits du poivre sont d'abord des baies vertes, puis rouges, puis noires. En séchant, elles deviennent ridées et brun foncé. Leur intérieur est gris ou jaunâtre. Ils ne renferment qu'une seule graine. Ces fruits sont aromatiques ; ils ont une saveur chaude et piquante (Liwei et al., 2004).



Figure 02 : Piper nigrum ; A - Aspect de la plante; B- baies vertes; C- Fruits noirs, blancs et Verts ; D- Grain de poivre (Ahmad et al., 2012).

I.2.2. Répartition géographique

Le poivrier est une liane d'habitat forestier et de climat équatorial. Il prospère idéalement dans une zone géographique située entre le 15^{ème} degré de latitude Nord et le 15^{ème} degré de latitude sud. Il peut être rencontré aussi en climat tropical mais à saison sèche plus ou moins marquée. Les principales zones de culture du poivre sont :

- Linde : dans l'état du Kerala
- L'Indonésie : à Kalimantan Sumatra et sur l'île de Bangka

- La Malaisie : dans l'état de Sarawak
- Le Brésil : dans la province de Para
- Le Vietnam
- Le Madagascar
- L'Afrique de l'Ouest : du Ghana à l'Angola. (Pham, 2007)

I.2.3. Classification

Règne : *Plantae*

Classe : *Equisetopsida*

Classe secondaire : *Magnoliidae*

Ordre superbe : *Magnoliidae*

Ordre : *Pipérales*

Famille : *Piperaceae*

Genre : *Piper*

Espèce : *Piper nigrum* (Damanhour et Aftab, 2014).

I.2.4. Composition générale du *Piper nigrum*

En général, le poivre contient en pourcentage de la masse brute :

- 4 à 6 % de **matières minérales**
- 40 à 50 % d'**amidon** pour le poivre noir, et 60 à 65% pour le poivre blanc
- 5 à 10% de **lipides** présents dans le poivre sont représentés par des acides gras comme l'acide palmitique (16-30%) ; l'acide oléique (18-29%), l'acide linoléique (25-35%) et l'acide linoléique (8-19%).
- 10 à 12% de **protides**
- 5 à 10% de **résine** pour le poivre noir, et moins pour le poivre blanc
- 1 à 3% d'**huile essentielle** pour le poivre noir, et moins de 1% pour le poivre blanc (Pham, 2007).

I.2.5. Composition biochimique

Les investigations phytochimiques sur le *Piper nigrum* indiquent qu'il contient différents types de composés phénoliques telles que les flavonoïdes, alcaloïdes, amides, stéroïdes, lignanes, neolignanes, terpènes, chalcones...etc. Et parmi les composés identifiés on trouve : Pipéramide, Pipéramine, Pipérettine, Pipéricide, Pipérine, Pipérolein B, Sarmentine, Sarmentosine, Retrofractamide. Pipérine est le premier composé pharmacologiquement actif (**Ahmad et al., 2012**).

Le poivre est également riche en huiles essentielles avec un rendement de 10 à 35 ml/kg. (**Botrel et al., 2001**).

I.2.6. Domaines d'utilisation

Le poivre noir est caractérisé par un large spectre d'utilisation. Cette épice à la saveur piquante se marie très bien avec les plats de viande, les grillades, les sauces, le poisson et autres. Comme les grains du poivre noir sont bactéricides, ils sont également excellents pour la conservation des aliments. (**Mena, 2016**).

Les propriétés du poivre noir sont nombreuses ; il réchauffe, fébrifuge, diurétique, stimulant digestif et utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise comme médicament naturel calmant. Ses substances sont également utilisées dans la médecine ayurvédique contre le nez bouché, les vertiges et les inflammations de la peau. (**Mena, 2016**).

Pipérine, pipene, Pipéramide et le Pipéramine se sont avérés pour posséder des déférentes activités pharmacologiques (**Ahmad et al., 2012**). Ces composés montrent une gamme de propriétés physiologiques, telles que les effets anti-inflammatoires, antimicrobiens et antioxydants (**Ayyad, 2014**).



Chapitre II :
Matériel et méthodes

Le but de ce travail est l'étude de l'activité antifongique des différentes concentrations d'extrait aqueux froid et chaud de poivre noir « *Piper nigrum* » sur quelques souches des moisissures contaminants le blé dur stocké.

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Poivre noir « *Piper nigrum* »

Le matériel végétal qui est le poivre noir a été acheté au marché de ville de Ouargla en Février 2018. En veillant sur l'odeur forte et la couleur éclatante caractéristique de poivre noir.



Photo 01 : Grains de *Piper nigrum*

II. 2. Souches fongiques

Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité biologique de l'extraits aqueux chaud et froid de poivre noir ont été isolées à partir du blé dur stockée, par **Kemassi** et **Azouzi (2017)**.

Les souches ont été isolées, purifiées (sur le milieu de culture PDA) et identifiées (L'identification des isolats se fait sur différents milieux de culture qui sont : **CYA**, **G25N**, **MEA**, **CZ**, **YES** et **CDA**). Il s'agit d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus terreus*.

II. 3. Préparation des extraits aqueux

II.3.1. Séchage

Les graines sont séchées à l'air libre pendant trois semaines, à l'abri de la chaleur et de la lumière pour éviter l'oxydation.

II.3.2. Broyage

Les graines de poivre noir ont été concassées dans un mortier, la poudre obtenue a été conservée dans des récipients jusqu'à l'utilisation.

II.3.3. Préparation de l'extrait aqueux froid

Après le séchage et le broyage de l'épice on procède à la macération pendant 24 heures sous agitation continue à 200 rpm/min à température de 25°C ; où une quantité de 10 g de poivre noir est prise dans un Erlenmeyer, à laquelle nous avons ajouté 100 ml d'eau distillé (**Razak et al., 2009**). Le mélange est filtré sur papier filtre Wattman et ensuite centrifugé à 3600 t/min pendant 20 min.

On récupère le surnageant et on procède à une micro filtration à l'aide d'un micro-filtre de 0,22 µm pour sa stérilisation. Cet extrait obtenu est conservé dans un flacon stérile à 4°C à l'abri de la lumière (figure 03).

II.3.4. Préparation de l'extrait aqueux chaud

Une quantité de 10 g de poivre noir est prise dans un Erlenmeyer, à laquelle nous avons ajouté 100 ml d'eau distillé stérile bouillante à 100 °C. Après environ une nuit (24 h) de macération sous agitation continue à 200 rpm/min, le mélange est filtré sur papier filtre Wattman N° 01, ensuite centrifugé à 3600 t/min pendant 20 min. On récupère le surnageant et on procède à une micro filtration à l'aide d'un micro-filtre de 0,22 µm pour sa stérilisation (Figure 03) (**Bassimane et Maamri, 2017**). L'extrait obtenu est conservé dans un flacon stérile à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'au moment de leurs utilisations

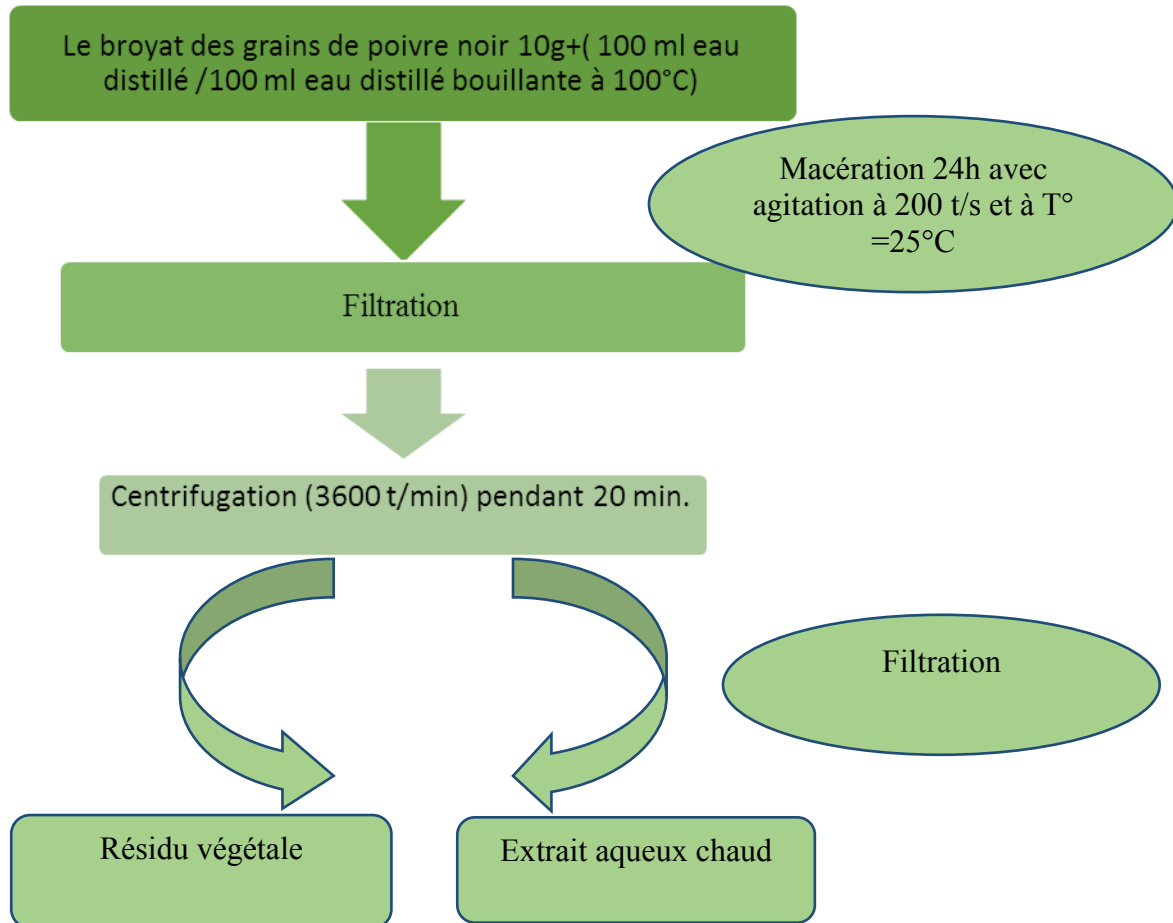


Figure 03: Etapes de la préparation des extraits aqueux froid et chaud de *Piper nigrum*.

II.3.5. Analyses physiques d'extrait aqueux

a. Mesure du pH

Pour l'estimation de l'acidité ou l'alcalinité des extraits aqueux chaud et froid obtenus, la mesure du pH est réalisée à l'aide du pH mètre.

b. Mesure de la conductivité électrique

La mesure de la conductivité électrique des extraits aqueux chaud et froid obtenus est réalisée à l'aide du conductivimètre.

c. Indice de réfraction

L'indice de réfraction des extraits aqueux chaud et froid du poivre noir est obtenu par la réalisation du rapport entre le sinus de l'angle incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un

rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant par l'air dans l'extrait aqueux maintenue à une température constante. Cet indice est déterminé par une lecture directe à l'aide d'un réfractomètre classique.

II.3.6. Détermination du rendement des extraits secs

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir de la poudre végétale. Il est exprimé en pourcentage ou sans unité. En pratique, on a fait le rapport de la masse de l'extrait sur la masse de la poudre végétale qui a servi pour l'extraction qu'on a multiplié par 100. Ceci se traduit par la formule suivante :

$$r = (mx100)/M$$

(r : rendement d'extraction ; m : masse de l'extrait sec ; M : masse de la poudre de drogue) (Djenebet *al.*, 2016).

Remarque : la détermination du rendement des extraits secs est réalisée à l'aide d'étuve.

II.4. Tests phytochimiques des extraits aqueux

Les composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans les graines de la plante. Ces dernières vont servir à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques (Bruneton, 1999).

II.4.1. Détection des polyphénols

a. Détection des tanins

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl₃ (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins (Karumiet *al.*, 2004).

b. Détection des coumarines

Les coumarines sont révélées à partir de 5 ml d'extrait placé dans un tube porté à ébullition jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 ml, ce volume est ajouté à 1ml d'eau chaude. Après l'agitation, le volume total est divisé en deux volumes, l'un sert de témoin et l'autre est

ajouté à 0.5ml de NH₄OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (**Bruneton, 1999**).

c. Détection des anthocyanes

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait dans un tube auquel on ajoute 15ml d'H₂SO₄ à (10%) (milieu acide), après agitation, le mélange est ajouté à 5 ml NH₄OH à (10%) (milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique (**Bruneton, 1999**).

d. Détection des flavonoïdes

Un mélange de 3ml de l'extrait + 4 ml chlorure d'aluminium (1% méthanol), l'apparition de la coloration jaune foncé indique la présence des flavonoïdes (**Khan et al., 2011**).

e. Détection des anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait sont ajoutés à 5 ml de NH₄OH à (10%). Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinone (**Oloyede, 2005**).

f. Détection des saponosides

Pour la détection des saponosides, 10 ml d'extrait placé dans un tube à essais sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Koffi et al., 2009**).

II.4.2. Détection des terpènes

a. Détection des stéroïdes

Les stéroïdes sont révélés après addition de 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml d'extrait à chaud. Le mélange est ajouté à 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation l'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive (**Bruneton, 1999**).

II.4.3. Détection des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10 ml d'extrait sont évaporés jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,2ml, sur lequel 1,5 ml de HCl à

(2%) sont ajoutés. Après agitation de la solution acide, 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer ou Wagner sont ajoutés. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (Mojab *et al.*, 2003).

Toutes les expériences des tests phytochimiques sont réalisées en triplicata pour vérifier la reproductibilité des résultats.

II.5. Essais d'activité antifongique des extraits aqueux

II.5.1. Activation des souches

Les souches fongiques isolées préalablement ont été conservées pendant une année en milieu solide PDA. L'activation des souches fongiques est effectuée par prélèvement d'un fragment mycélien pour faire un nouvel ensemencement sur le même milieu de culture sans agent sélectif (PDA). Ce fragment mycélien est ensemencé au centre de la boîte pour obtenir des souches actives après leurs incubations à 25 °C.

II.5.2. Préparation des suspensions sporales

Pour la conservation des isolats on a préparé ainsi des suspensions sporales, Elle consiste en l'inoculation de quelques spores d'une culture jeune (de chaque espèce) dans des tubes d'Eppendorf contenant une suspension semi solide à base de 0,1% d'Agar et quelques gouttes de Tween 80 (Pitt, 1973 ; Ramirez, 1982). A partir de cette suspension, on facilite la réalisation de la méthode de contact direct utilisé pour l'activité antifongique de nos extraits aqueux.

II.5.3. Souches fongiques testées

L'activité antifongique des extraits chaud et froid a été réalisée sur trois souches *A.ochraceus*, *A.niger* et *A.terreus* . Ces derniers vont être testée *in vitro* par la méthode de contact direct, sur milieu gélosé « PDA » qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique (fongistatique ou fongicide) des extraits aqueux de poivre noir et pour déterminer les taux d'inhibition, en comparant leurs actions à diverses concentrations sur la croissance mycélienne (Fandohan, 2004).

II.5.4. Préparation des différentes concentrations des extraits aqueux chaud et froid

Nous avons préparé 04 concentrations d'extraits aqueux (Eq) ajustées à l'aide de PDA, comme suit :

- * **Concentration 1 (0%)**= 0ml Eq + 60 ml PDA.
- * **Concentration 2 (20%)**=12ml Eq +48 ml PDA.
- * **Concentration 3 (25%)**=15ml Eq + 45 ml PDA.
- * **Concentration 4 (30%)**= 18ml Eq +42 ml PDA.

Les mélanges sont agités jusqu'à leur homogénéisation, puis coulés dans boîtes Pétrie de (53 mm). Après solidification du milieu (PDA+ Eq), l'inoculation se fait par une suspension sporale, en mettant une goutte au centre de boîte à l'aide d'une micropipette stérile. Nous opérons de la même façon pour chaque champignon et chaque concentration d'extrait aqueux (figure04).

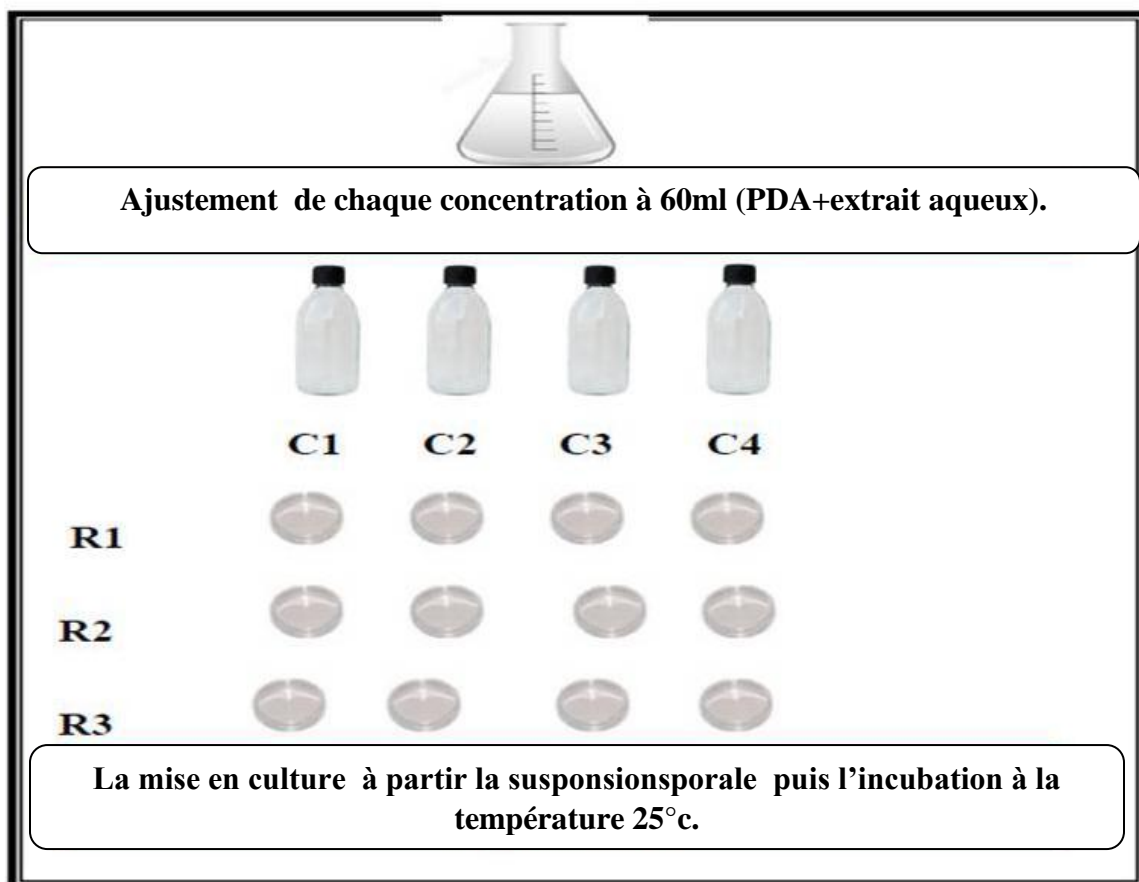


Figure 04 : Préparation des différentes concentrations des extraits aqueux

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le para-film et incubées jusqu' à la boîte de Pétri de témoin rempli la boîte et à l'obscurité à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Chaque concentration d'extraits aqueux chaud et froid est répétée trois fois. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions d'obscurité et de température, se fait une observation quotidiennement.

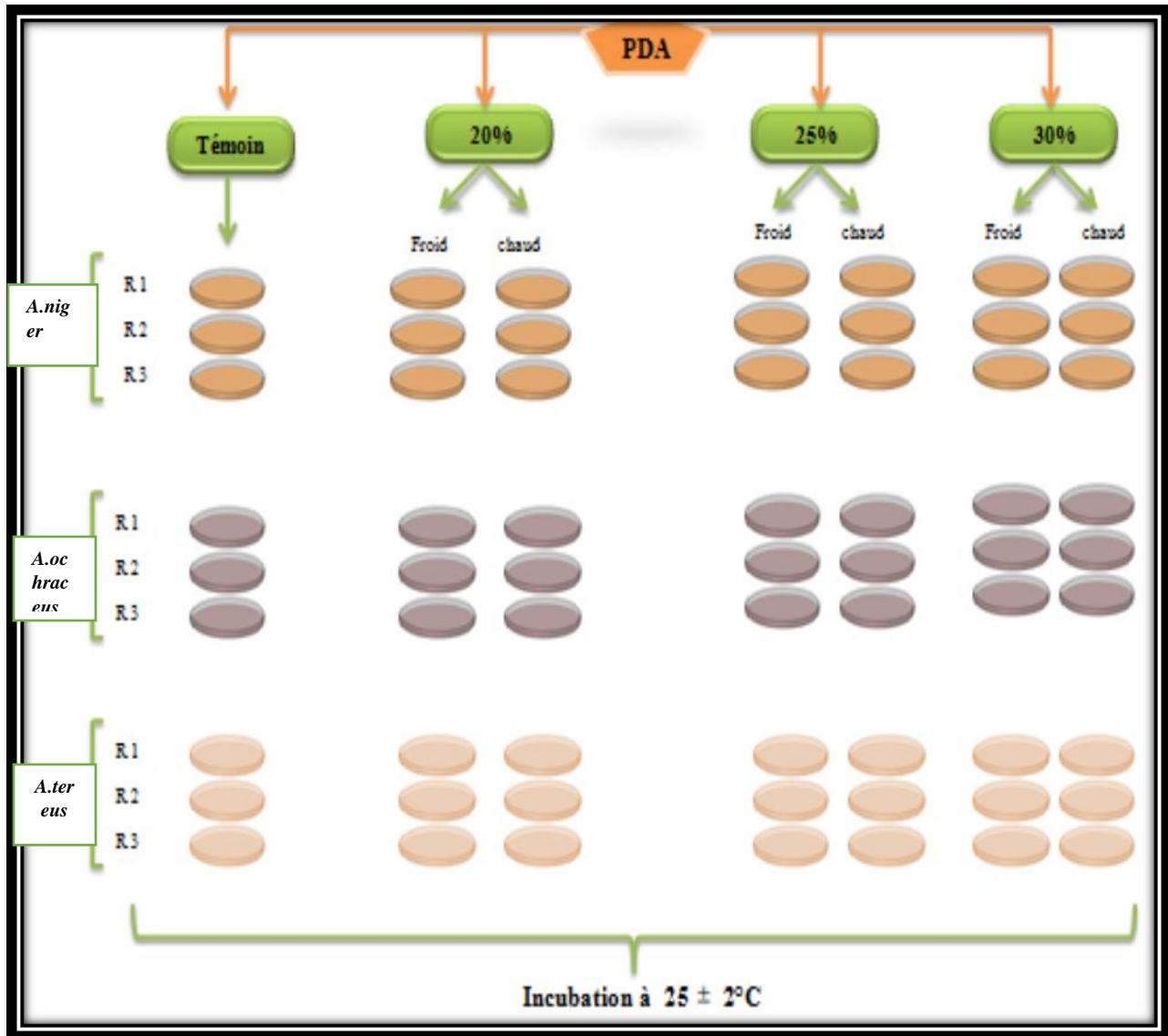


Figure 05 : Protocole expérimentale des différentes concentrations des extraits aqueux de poivre noir (*A. niger* ; *A. ochraceus* ; *A. terreus*)

II.5.5. La méthode de contact direct

Pour effectuer le test antifongique, nous avons adopté la méthode de contact direct. Dans cette étape on utilise le PDA acidifié par l'acide lactique par ce que les moisissures peuvent métaboliser l'acide lactique mais les bactéries et les levures vont être inhibées.

Après la préparation et la stérilisation du PDA on ajoute de l'acide lactique 25% a raison de 5ml par 100ml de PDA, puis on mélange notre PDA acidifiée avec l'extrait de poivre noir stérile avec des concentrations déterminée. Le mélange (PDA stérilise+ Eq) a été coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification on va les ensemercer par des suspensions sporales de différentes espèces suivies d'une incubation de 15 jours à 25 + 2°C.

II.6. Expression des résultats des tests antifongiques

Pour évaluer l'effet des extraits aqueux chaud et froid de poivre noir sur les souches fongique choisis, nous avons utilisé certains paramètres et critère macroscopique et microscopique tel que :

II.6.1. Croissance radiale

La croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 heures en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins qu'ils sont démarrés le même jour et dans les mêmes conditions (**Kemassi et Azouzi, 2017**).

a. Cinétique de la croissance mycélienne

La Cinétique de la croissance mycélienne correspond aux variations dans le temps, du diamètre du disque des trois champignons avec différentes concentrations. La cinétique de croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 heures en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins dans les mêmes conditions (**Kemassi et Azouzi, 2017**).

b. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée à la fin de l'expérience, à savoir au bout de 216h (9 jours) d'incubation, en mesurant la moyenne de trois diamètres. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins ayant démarré le même jour et dans les mêmes conditions. (Ghedairi,2015)

c. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC)

La vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule :

$$VC = [D1/Te1] + [(D2-D1)/Te2] + [(D3-D2)/Te3] + \dots + [(Dn-Dn-1)/Ten]$$

D : Diamètre de la zone de croissance pour chaque jour.

Te : Temps d'incubation (Mohammedi, 2013).

d. Taux d'inhibition (TI%)

Pour cette méthode, la technique consiste à mesurer les diamètres des différentes colonies de champignons après le temps d'incubation requis puis résoudre l'équation suivante :

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

TI (%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins ».

dE= Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante (Kordali et al., 2003).

II.6.2. Test production de spore

La méthode utilisée pour la détection de l'inhibition de sporulation est la méthode de **Leroux et al., (1978)** : premièrement il faut prélever un disque fongique à partir de centre de la colonie de chaque boîtes Pétri puis à l'aide des embouts stérile. On va transférer le disque dans un Eppendorf contenant 1 ml d'eau physiologique stérile, on agite pendant 10 min pour déloger les spores. Le nombre de spores a été déterminé à l'aide d'une cellule de Malassez. Unité de concentration sera (spore/ml).

Le pourcentage de réduction de la sporulation provoquée par les extraits aqueux chaud et froids du poivre noir a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$Is = (No - N) / No \times 100$$

Is: inhibition de sporulation

No : le nombre moyen de spores estimé chez le témoin

N : le nombre moyen de spores estimé en présence de l'extrait.

II.6.3. Test germination de spore

Pour tester l'inhibition de la germination des spores par 20% et 50% d'extrait aqueux de *Piper nigrum*, la méthode a été réaliser selon **MLAIKI (1970)** avec modification :

La suspension sporale témoin récoltée de test précédant est ajustée par dilution à 10^4 spore/ ml avec d'eau distillée. Puis dans des tubes d'Eppendorf on met 300 μ l de suspension sporale avec 300 μ l de l'extrait aqueux, On a préparé deux concentrations 40% et 100% pour avoir après ce mélange les concentrations 20% et 50% de test, Le témoin contient 300 μ l d'eau distillée stérile et 300 μ l de suspension sporale, l'incubation est pendant 24h dans 25°C.

L'étape suivant consiste à étale 50 μ l de chaque Eppendorf sur des lames recouvré par un milieu à base d'extrait de malt (15 g d'extrait de malt, 15 g d'agar, compléter à 1 l avec de l'eau distillée) L'incubation se fait à 25°C et à l'obscurité pendant 24 heures. Le comptage des spores, germées ou non germées est déterminé sous microscope. Une spore est considérée germée si la

longueur du tube germinatif est supérieure à plus petit diamètre de spores (**Mlaiki, 1970 ; Kemassi et Azouzi, 2017**).

On compare le pourcentage de germination pour chaque concentration par la formule suivante (**Amadi et al., 2014**) :

(Nombre de spore germé / nombre total des spores) x 100.

II.7. Analyse statistique

Les données relatives à chaque essai ont fait l'objet d'une analyse statistique (tableaux, histogrammes, courbe) des données traités par un logiciel Excel 2007.



Chapitre III :
Résultats et discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Caractères physiques des extraits aqueux chaud et froid

Tableau 01: Les caractères physiques des extraits aqueux froid et chaud de *Piper nigrum*.

Param Eq	pH	Conductivité électrique (ms/cm)	Indice de réfraction	Rendement en (%)
Extraits aqueux froid	6.2	3.4	1.335	25.19
Extraits aqueux chaud	6.3	3.4	1.335	29.76

Le tableau ci-dessus représente les caractères physiques des extraits aqueux froid et chaud de *Piper nigrum*, d'après nos résultats on remarque que le pH est acide et il n'y a aucune différence dans toutes les paramètres physiques étudiés entre les deux extraits aqueux sauf qu'aux rendements qu'on obtient la valeur la plus élevée dans l'extrait aqueux chaud qui est de 29.76 % par rapport à l'extrait aqueux froid qui est de 25,15% seulement.

III.1.2. Tests phytochimiques

La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou des précipitations par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur l'extrait aqueux froid et chaud de *Piper nigrum*.

Le résultat de ce criblage phytochimiques est résumé dans le Tableau 02, qui révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire. Effectivement 08 groupes de composés bioactifs sont : tannins, coumarine, anthocyanes, anthraquinone, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes et stéroïdes.

Tableau 02: Teste phytochimiques des extraits aqueux froid et chaud de *Piper nigrum*

Groupe chimique		Extraits aqueux	
		Froid	Chaud
Polyphénols	-Tannins	(+)	(+)
	-Coumarines	(-)	(-)
	-Anthocyanes	(-)	(-)
	-Flavonoïdes	(+)	(+)
	Anthraquinone	(+)	(+)
	-Saponosides	(+)	(+)
Terpènes	Stéroïdes	(+)	(+)
Alcaloïdes	Alcaloïdes	(-)	(-)

(-): Absence

(+): Présence

Les résultats obtenus révèlent que les deux extraits aqueux froid et chaud de poivre noir possèdent la même composition chimique. La caractérisation chimique de ces deux extraits aqueux a démontré la présence des Polyphénols sous forme des Tannins, et Anthraquinone, et des Saponosides avec l'absence d'Anthocyane et Coumarine ; La présence des terpènes sous forme des stéroïdes.

Les résultats de ce criblage phytochimiques indiquent aussi l'absence d'alcaloïdes dans la composition des deux extraits aqueux du poivre noir.

III.2. Activité Antifongique

III.2.1. Activité antifongique des extraits aqueux.

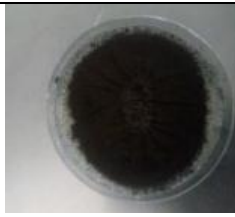



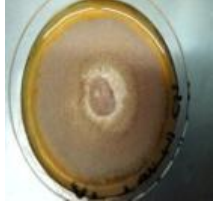



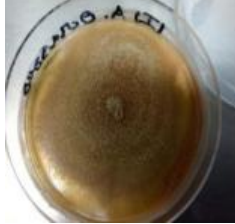
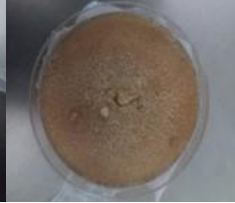

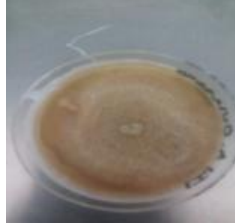
L'activité des extraits aqueux de *Piper nigrum* à différentes concentrations sur des différentes souches fongiques testés est révélée par la variation de :

- Croissance mycélienne
- Vitesse de croissance de mycélium
- Taux d'inhibition.
- Production de spores (T S)
- Germination de spores (TG)

III.2.1.1.Extrait aqueux froid

a. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur les souches testées

Tableau03 : Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur les souches testées

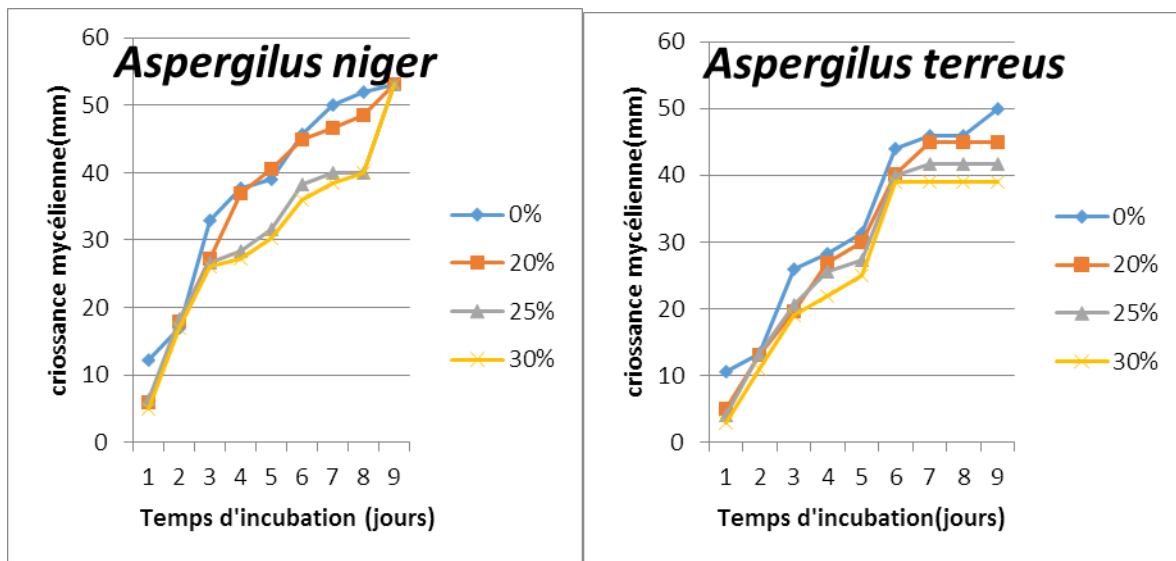
Concentration \ Espèce	0%	20%	25%	30%
<i>A.niger</i>				
<i>A.terreus</i>				
<i>A.ochraceus</i>				

Le tableau ci-dessus représente l'effet de l'extrait aqueux froid sur la morphologie des souches testé au cours de temps d'incubation (9j), d'après les résultats obtenus on remarque que la réponse des souches sur l'extrait aqueux froid est différente d'une espèce à l'autre.

L'*A.niger* est le plus résistant dans toutes les concentrations. Alors que *A.chraceus* et *A.terreus* possèdent une résistance partielle qui varie d'une concentration, à l'autre.

b. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur la cinétique de croissance mycélienne

Le graphe suivant résume les résultats de la croissance mycélienne en (mm) des souches fongiques en fonction du temps d'incubation et de la concentration d'Eq froid :



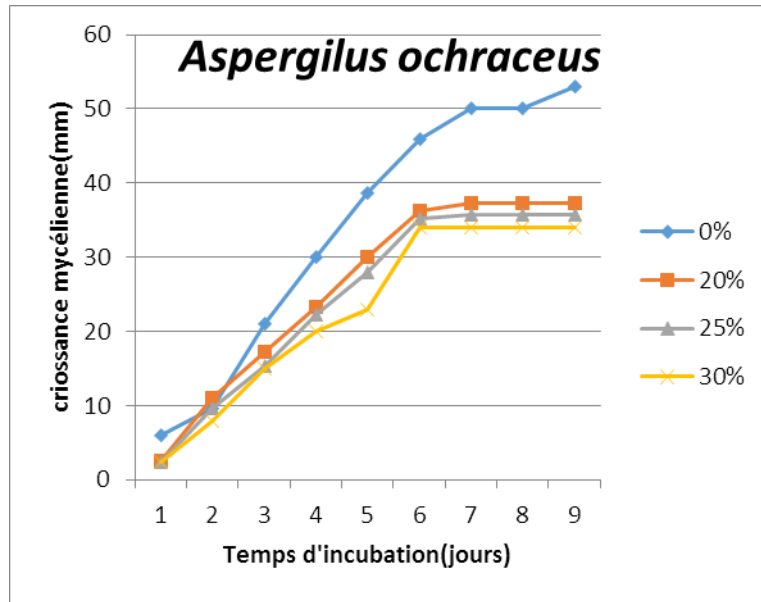


Figure 06: Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction du temps et concentration d'extrait aqueux

L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne pour les différentes concentrations d'extraits aqueux froid de *Piper nigrum* et différentes souches fongiques.

Les résultats indiquent que la croissance mycélienne journalière pour le témoin est importante mais en diamètres différents qui dépendent du temps d'incubation.

Les résultats de l'effet de différentes concentrations d'extraits aqueux sur la cinétique de croissance mycélienne sont présentés dans la Figure 07. Les diamètres varient entre 1 mm et 53mm, le diamètre de témoin après 1jour est 6mm à13mm. Il atteint 53 mm après 9 jours pour les trois souches testées.

On observe que la croissance mycélienne est commencée après 1 jour pour tout le traitement de (20% ,25% ,30%) à un diamètre différent. Les diamètres de la croissance augmentent avec le temps d'incubation

c. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux sur la croissance mycélienne

La croissance mycélienne final a été mesurée lorsque les témoins atteindront leur croissance maximale sur les boîtes Pétries contenant le milieu PDA.

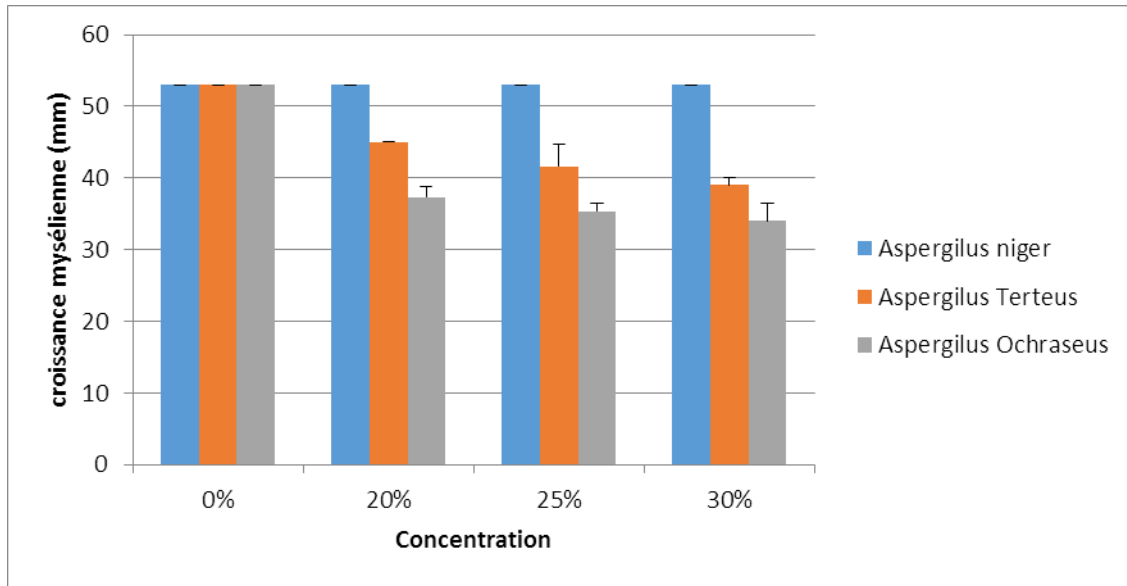


Figure 07: Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux froid de *piper nigrum*.

On observe que le diamètre mycélien final est différent d'espèce à une autre. L'*Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus terreus* possède une variation de croissance plus remarquable en fonction de concentration d'extrait, cette croissance diminue en augmentant la concentration jusqu'à elle atteindre 34mm et 39mm respectivement à concentration 30%.

Pour l'*Aspergillus Niger* les diamètres mycéliens finals dans les différentes concentrations sont semblables au témoin.

d. Vitesse de croissance mycélienne

La vitesse de la croissance mycélienne des trois souches fongiques en fonction de la concentration d'Eq froid est présentée dans la figure :

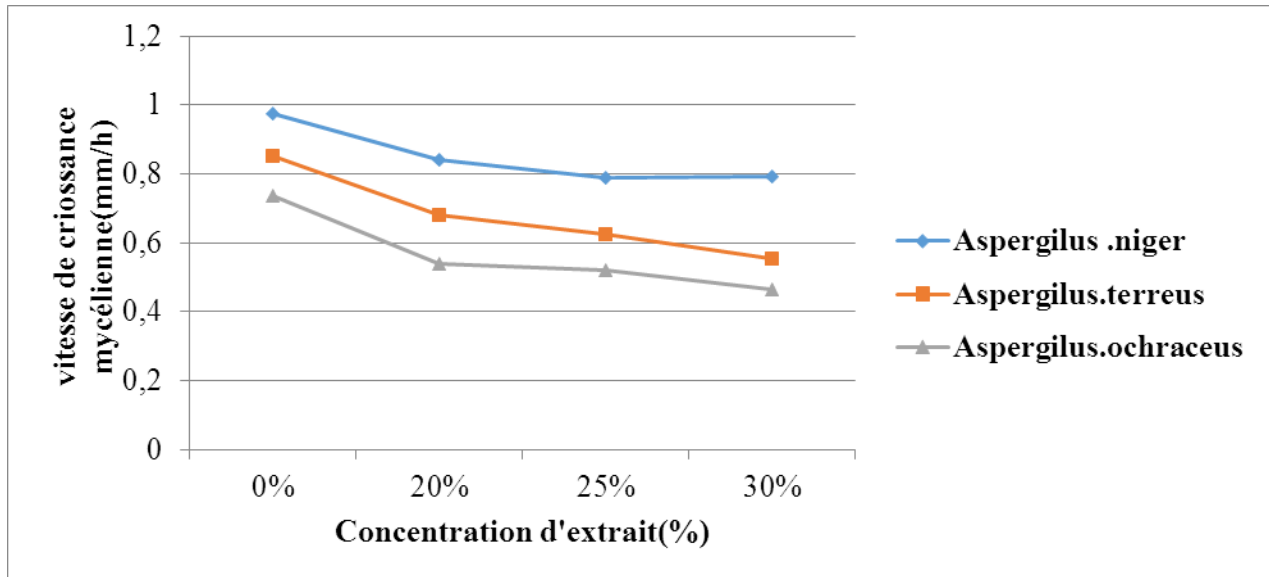


Figure 08 : Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux froid de *Piper nigrum*.

La figure 08, présente la vitesse de la croissance mycélienne des trois souches fongiques en fonction de la concentration d'Eq froid. On remarque que la plus haute vitesse de croissance mycélienne est enregistrée à 0%, en absence d'extrait aqueux avec une vitesse de 0,97mm/h, puis cette vitesse a diminué jusqu'à 0,794 mm/h dans la concentration de 30% d'Eq pour *A.niger* et à 0,854mm/h, 0,555mm/h pour *A.terreus* et 0,737mm/h ,0,465mm/h pour *A.ochraceus*.

La vitesse de la croissance mycélienne décroît avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux. A partir de ses résultats on constate que *A.niger* possède la vitesse de croissance mycélienne la plus élevée. Par contre, la vitesse la plus lente a été remarquée chez *A.ochraceus*.

e. Taux d'inhibition

Les taux d'inhibition d'extrait aqueux froid étudié sur les souches fongiques testées sont regroupés dans la figure 10.

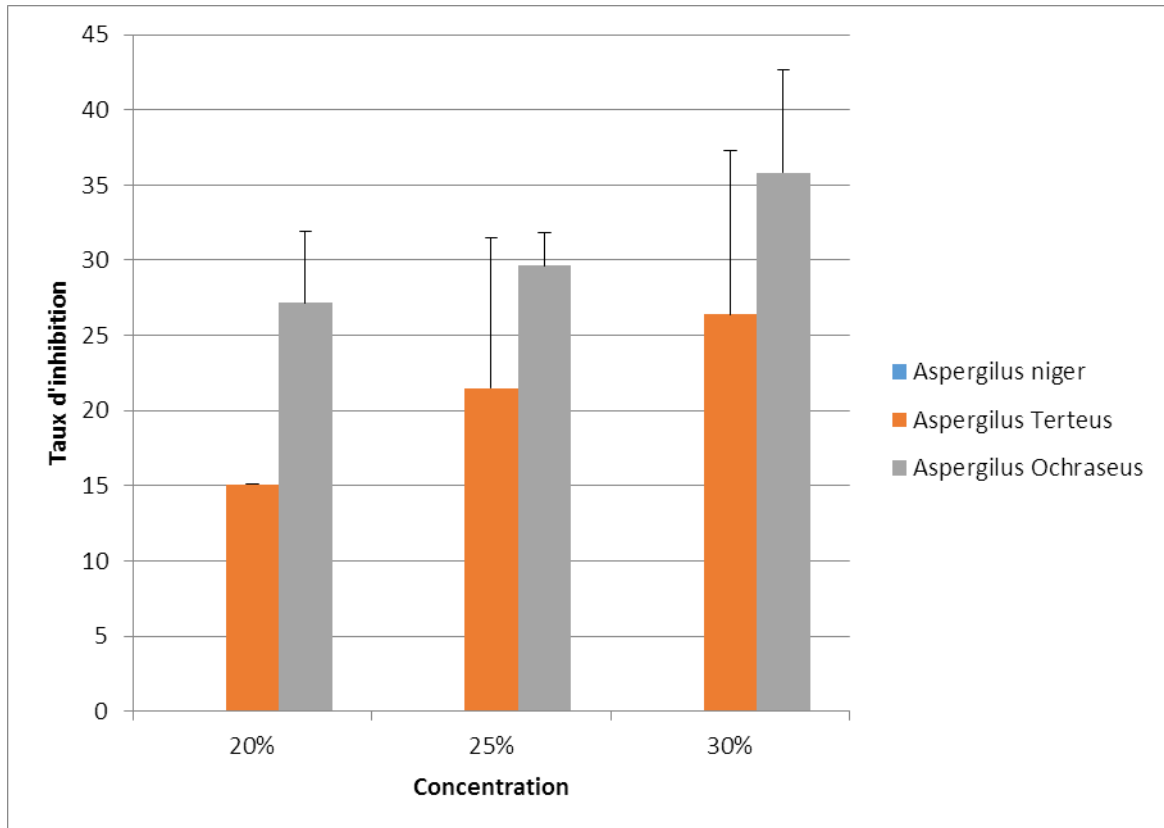


Figure 09 : Taux d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait aqueux froid de *Piper nigrum*.

La figure 09 résume les résultats d'inhibition du diamètre mycélienne sous l'effet de l'extrait aqueux froid de *piper nigrum* au cours du temps d'incubation (jours).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux froid possède une activité inhibitrice différente, dont l'effet est fongistatique, car on observe une inhibition partielle chez deux espèces *Aspergillus terreus* et *Aspergillus ochraceus* dans les différentes concentrations 20% 25% 30%.Sauf pour l'*Aspergillus niger* qui n'a représenté aucune inhibition dans les trois concentrations.

f. Production de spores (T S)

La figure 10 représente le taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.

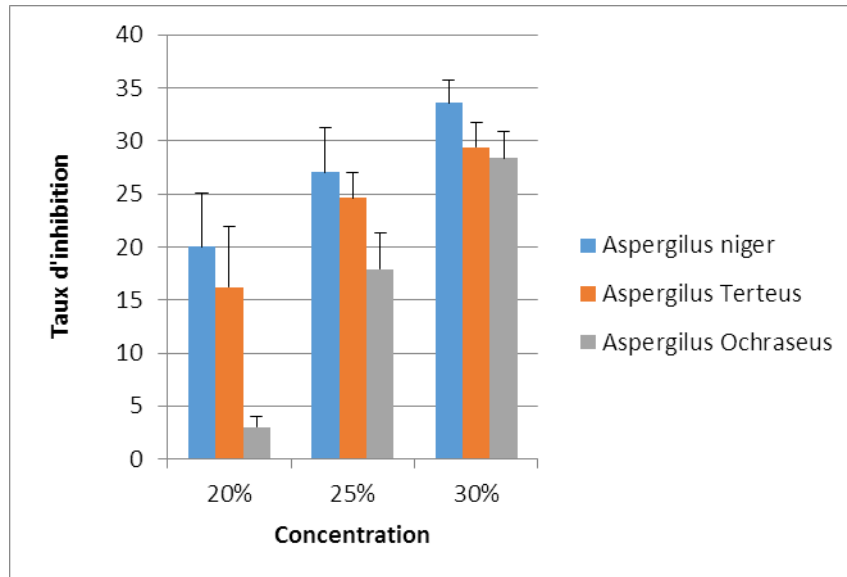


Figure10 : Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.

D'après ce graphe, on observe que le taux d'inhibition de production des spores s'accroît en augmentant la concentration d'extrait aqueux froid. On remarque que la plus forte inhibition de la sporulation dans la concentration 30% est de 33.56% chez *A. Niger*, et la plus faible inhibition en 20% est de 3.02% chez *A. ochraceus*. Chez *A. niger* dans la concentration 20% TS est 20%, et 25% est 27.01%, *A. terreus* en 20% est 16.2%, dans le 25%, 30% est 24.63%, 29.37% respectivement, *A. ochraceus* en 25%, 30% est 17.9%, 28.36% respectivement.

g. Germination de spores (TG)

La figure11, représente l'inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différentes concentrations.

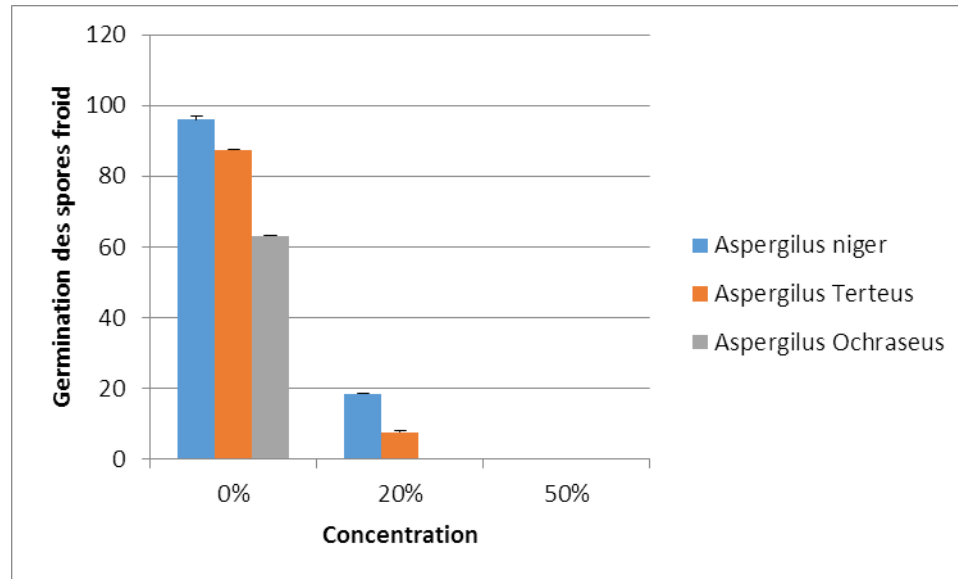


Figure11 : Inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.

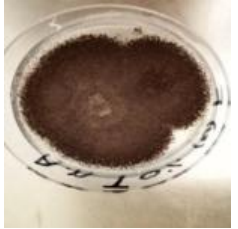
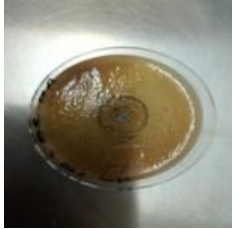

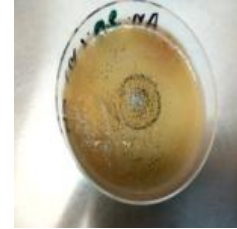
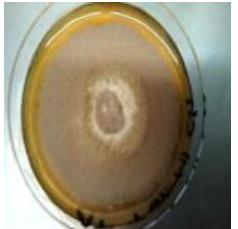

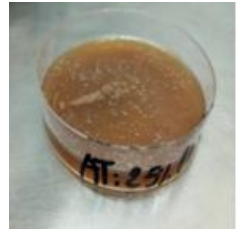





D'après les résultats obtenus on observe dans le témoin que après 24h la germination des spore est maximal presque 100% chez *A.niger* et *A. terreus* alors que chez *A. ochraceus* ce taux estimé inférieure est de 60%.

Si on compare le taux de germination de spores dans le témoin et en présence d'extrait on trouve une inhibition totale dans les concentrations 20% et 50% uniquement chez *A. ochraceus*, alors que chez *A niger* le TG dans la concentration 20% est la moitié de témoin, et en 50% TG est plus faible par rapport au témoin, et concernant l'*A terreus* le TG en 20% est estimé à 20%, et à la concentration 50% est plus faible par rapport au témoin.

III.2.1.2. Extrait aqueux chaud

a. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur les souches testées

Tableau 04 : Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur les souches testées

Espèce	0%	20%	25%	30%
<i>A.niger</i>				
<i>A.terreus</i>				
<i>A.Ochraceus</i>				

Le tableau ci-dessus représente l'effet de l'extrait aqueux chaud sur la morphologie des souches testé au cours de temps d'incubation (9j), d'après les résultats obtenus on remarque que l'activité antifongique s'accroît en augmentant la concentration de l'extrait aqueux chaud.

L'*A.ochraceus* est la souche la plus sensible à l'extrait aqueux chaud, suivi par *A.terreus*. La souche fongique la moins sensible remarquée est *A.niger*.

b. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur la cinétique de croissance mycélienne

Les résultats de l'effet de différentes concentrations d'Eq chaud sur la cinétique de croissance mycélienne sont présentés dans les figures suivantes :

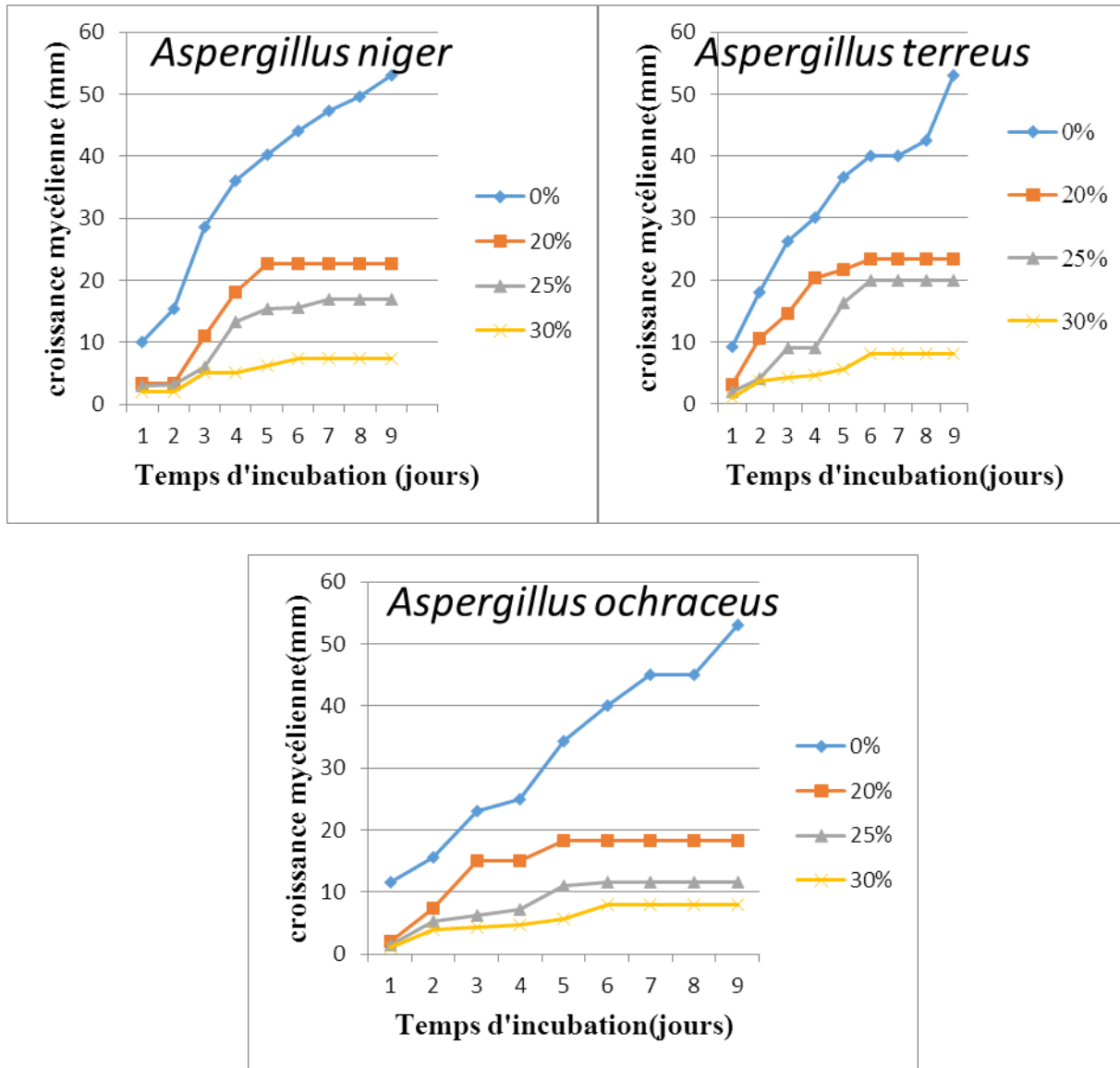


Figure 12 : Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction de temps et concentration d'extrait aqueux chaud de *Piper nigrum*.

D'après le graphe on remarque que la cinétique de la croissance chez les trois champignons au premier jour (après 24h) commence lentement par rapport au témoin dans toutes les concentrations.

Chez *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus* aux concentrations 20%, 25% et 30% la cinétique de croissance est presque semblable durant tous les jours. Elle est de 3mm à 22.6mm chez *Aspergillus niger*, et de 2mm à 20mm chez *Aspergillus terreus*. Alors que *Aspergillus ochraceus* dans ces toutes concentrations le diamètre de la croissance mycélienne est moins que les deux autres souches, elle est de 1mm et 18.3mm.

c. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur la croissance mycélienne

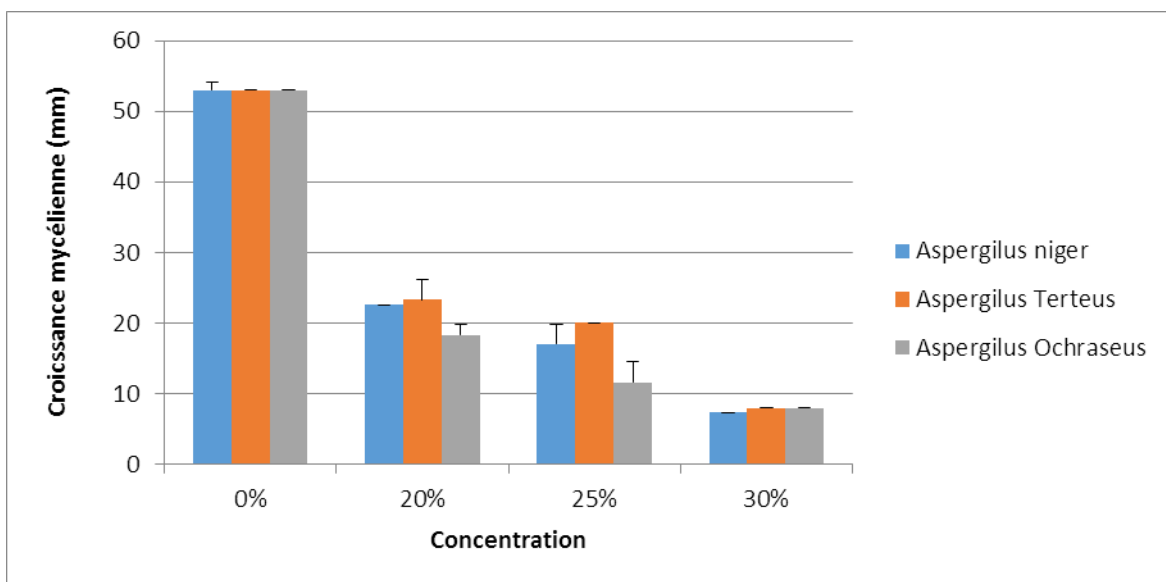


Figure13 :Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux chaud de *piper nigrum*.

La figure (13) résume les résultats du diamètre mycélien à la fin de l'expérience, à savoir au but de l'arrêt de croissance de témoin ou le témoin remplit la boîte de pétri en comparaison avec les différentes concentrations sous l'effet de l'extrait aqueux chaud de *Piper nigrum*. On remarque que les croissances mycéliennes diminuent par l'augmentation de la concentration

d'Eq chaud par rapport au témoin (0%). Pour *A.niger* et *terreus* le diamètre final enregistré en utilisant la concentration de 20% est la moitié de témoin, Alors que pour *A.ochraceus*, le diamètre final est plus faible par rapport aux autres souches. Les diamètres finals enregistrés en utilisant les concentrations 25% et 30% pour les trois souches testées sont moins de 10mm.

d. Vitesse de croissance mycélienne

La vitesse de la croissance mycélienne des trois souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud est présentée dans la figure 14.

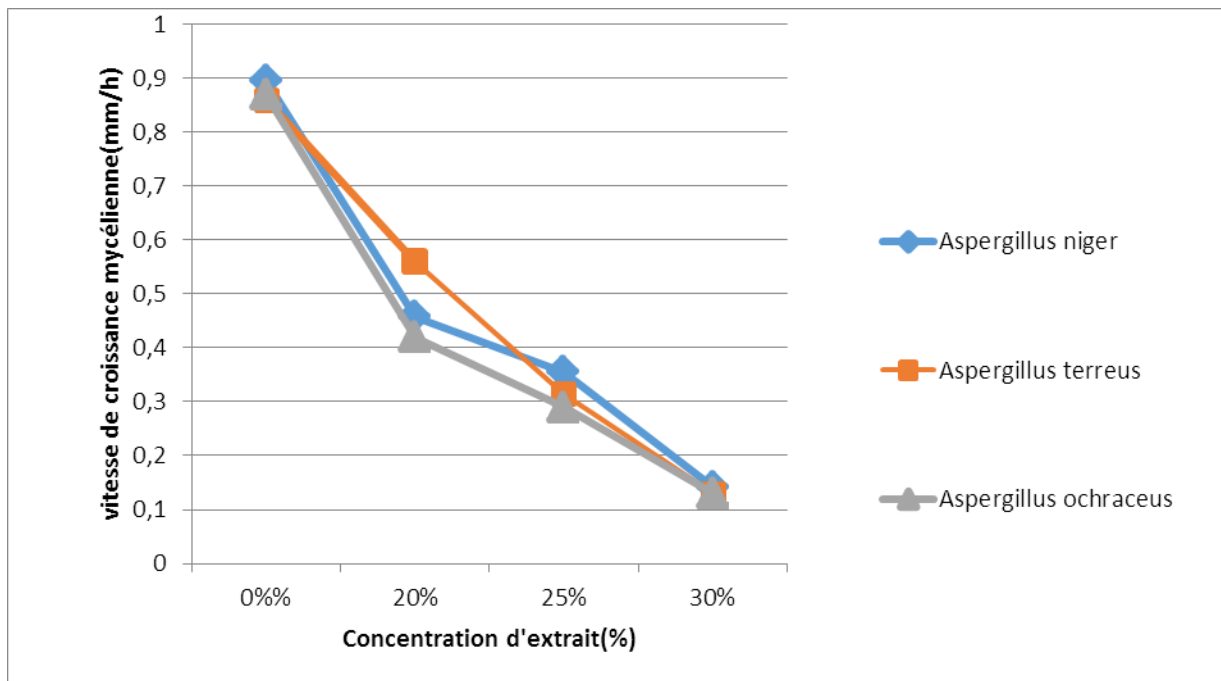


Figure 14 : Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux chaud de *Piper nigrum*.

On observe que la vitesse de la croissance mycélienne décroît par l'augmentation de la concentration d'extrait aqueux chaud de *piper nigrum*. La plus haute vitesse de croissance mycélienne est enregistrée à 0% en absence d'extrait aqueux avec une vitesse de 0,9 mm/h.

La vitesse des souches est décrie jusqu'à 0.15mm/h dans la concentration 30% d'extrait aqueux chaud de *piper nigrum*.

e. Taux d'inhibition

La figure 15 présente le taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud :

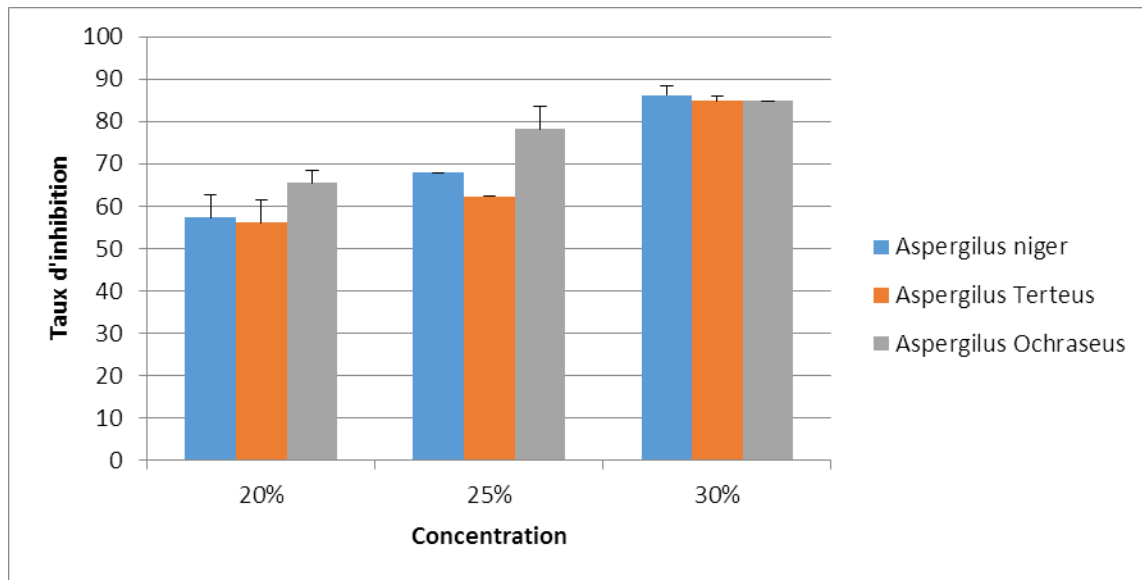


Figure 15 : Taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud

Selon le graphe, le taux d'inhibition s'accroît avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux chaud. On remarque que le TI le plus élevée est enregistrée à la concentration 30% d'extrait aqueux chaud, pour les toutes souches fongiques, ce TI est de 90,56 % chez *A.ochraceus*, 86.15 % chez *A.niger*, et 84.23% chez *A.terreus*.

Le TI est plus faible en utilisant la concentration 20%, il est de 65.47 % chez l'*A.ochraceus*, 57.35 % chez *A. niger*, et 56.03 % chez l'*A.terreus*.

f. Production de spores (T S)

La figure 16 représente le taux d'inhibition de la production de spores sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration.

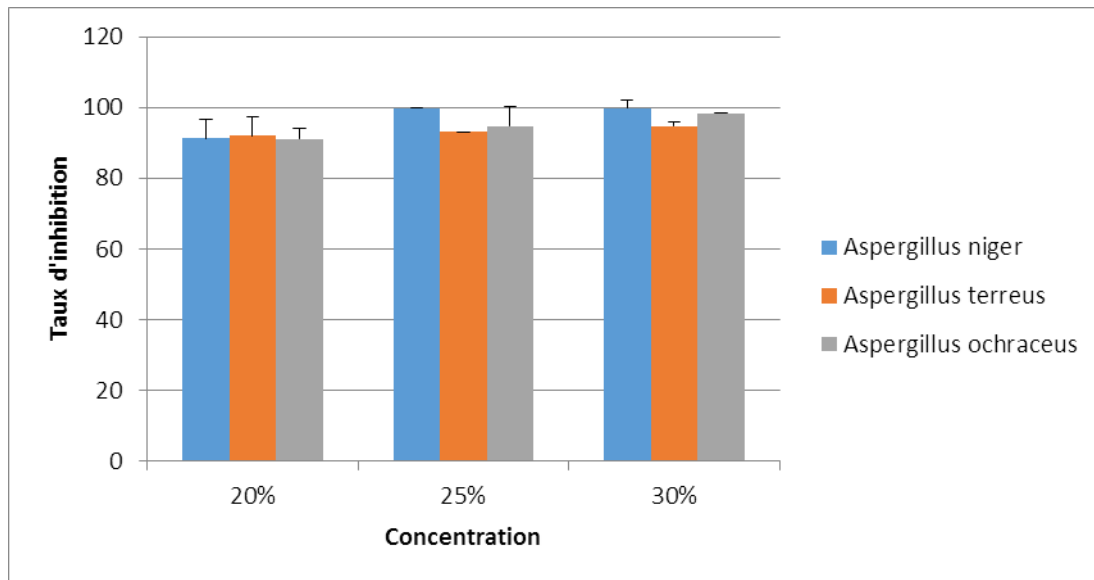


Figure 16 : Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration

On observe que pour la concentration 20%, le taux d'inhibition de production de spores est relativement élevé pour toutes les souches testées. Ce taux d'inhibition s'accroît en augmentant la concentration d'extrait aqueux chaud. Il est de 100% chez *A. niger* dans les concentrations 25% et 30%, alors qu'il est un peu faible pour *A. ochraceus*, et *A. terreus* dans les mêmes concentrations par rapport à *A. niger* mais avec une forte inhibition.

g. Germination de spores (TG)

La figure 17 représente l'inhibition de la germination de spore des souches testées sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration.

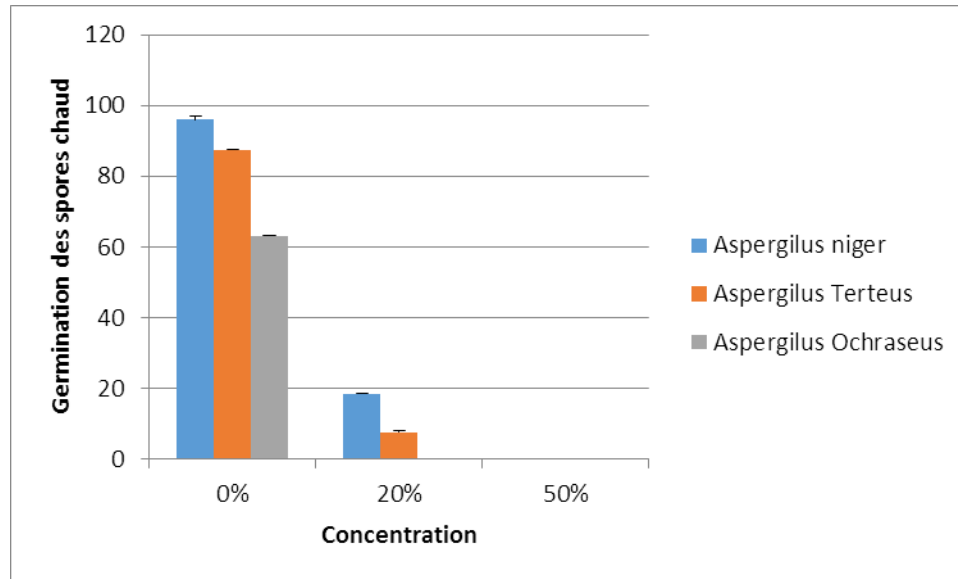


Figure17 : Inhibition de germination de spores sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration

On observe dans le témoin que après 24h le taux de germination des spore est de 96.01%, 87.38 % et 63.05 % chez *A.niger*, *A.terreus* ,et *A.Ochraceus* respectivement.

Si on compare le taux d'inhibition de germination de spores dans le témoin et en présence d'extrait aqueux chaud on trouve que dans la concentration 20% ce taux est de 18.40% et 7.55% chez *A.niger*, *A.terreus* respectivement, alors que chez *A.Ochraceus* on remarque l'absence d'inhibition de germination dans cette concentration. En utilisant la concentration à 50% de cet extrait, on observe une absence totale d'inhibition de germination des spores chez les trois souches testées.

III.3. Discussion

Notre travail a traité l'effet de l'activité antifongique de l'extrait aqueux froid et chaud de *Piper nigrum* sur quelques moisissures isolées à partir de blé dur stocké.

Les rendements obtenus des extraits aqueux de poivre noir (*Piper nigrum*) sont 25.19% et 29.76 % pour l'extrait aqueux froid et pour l'extrait aqueux chaud respectivement. Le faible taux de rendement d'extrait aqueux froid par rapport à celui de l'extrait aqueux chaud pourrait être expliqué par effet de la température élevée d'eau bouillante lors de la préparation de l'extrait aqueux chaud qui augmente la solubilité des composés chimique de l'épice en comparaison avec celle de l'extrait aqueux froid qui est obtenu en utilisant une eau à température ambiante lors de sa préparation.

La mesure de pH des extraits aqueux de poivre noir a donné un pH acide qui sont presque les mêmes 6.2 et 6.3 pour Eq froid et Eq chaud respectivement. **Ahmad et al., (2012)** a montré que l'acidité de poivre noir est due principalement à un composé phénolique « le pipérine » qui est le premier composé pharmacologiquement actif.

Les tests phytochimiques révèlent la présence des métabolites secondaires dans les deux extraits aqueux chaud et froid. Parmi eux ; les flavonoïdes, les tanins, les stéroïdes et les saponosides.

Les Terpènes (stéroïdes) affectent non seulement la perméabilité, mais aussi d'autres fonctions dans des membranes cellulaire, elles peuvent pénétrer dans les membranes cellulaires, pénétrer à l'intérieur de la cellule, et d'interagir avec des sites critiques tels que des enzymes et des protéines intracellulaires, conduisant à la mort cellulaire (**Omidbeygi et al., 2007**).

Les saponines sont une classe spéciale de glycosides qui ont d'une part, une caractéristique savonneuse et d'autre part, une très bonne activité antifongique (**Sadipoet al., 1991**).

Les travaux de **Bassou, (2007)** ont démontré que les tanins isolés des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons.

L'activité antifongique des différents extraits aqueux de *Piper nigrum* ont montré une forte inhibition de la croissance de *A.ochraceus* par rapport aux autres souches fongiques. Cette inhibition est de l'ordre de 35.84% et 90.56 % en utilisant la concentration de 30 % d'Eq froid et d'Eq chaud respectivement. On a remarqué une différence dans l'activité des deux extraits de poivre noir sur la même souche fongique, l'Eq chaud possède une activité forte par rapport à celle d'Eq froid. Cette différence pourrait être due au forte rendement obtenu d'Eq chaud, ainsi à l'aide d'une stimulation de quelques substances bioactives par la température élevé d'eau bouillante lors de la préparation de l'extrait.

L'activité antifongique des extraits aqueux du poivre noir peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés d'extrait. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cet extrait (**Giordani et al., 2008**). Les effets antifongiques des extraits aqueux des plantes peuvent être attribués aux différentes substances phytochimiques détectées lors du screening phytochimique. L'étude du **Abdelghani et al., (2008)** mettent aussi en relation l'activité antifongique des extraits avec les substances bioactives de la plante. Les métabolites secondaires dans les plantes leur confèrent la protection contre les bactéries, les champignons et les attaques pesticide et sont donc responsables de l'effort d'activité antimicrobienne contre certains micro-organismes (**Benattia et Bettayeb,2015**).

L'inhibition de la sporulation a été indiquée chez les trois souches des moisissures testées. Les résultats de **Amedi et al., (2014)** confirme nos résultats qui ont montré que la réduction de la sporulation a augmenté avec la concentration croissante des extraits.

Concernant l'inhibition de la germination des spores, elle a été très faible à nulle pour *A.ochraceus*, *A.terreus* dans les deux extrait froid et chaud, à part *A niger*. Par ailleurs dans les travaux de **Amedi et al., (2014)**, les extraits de gomme et de gingembre étaient efficaces pour inhiber la sporulation et la germination des spores d'*A. niger*.



Conclusion

Conclusion

Notre travail est basé sur l'étude de l'activité antifongique des extraits aqueux « froid » et « chaud » de poivre noir ou scientifiquement appelé *Piper nigrum* vis-à-vis certaines moisissures contaminants le blé dur stocké en vue d'être utilisé comme une alternative de fongicides chimiques. Les extraits aqueux froid et chaud possèdent des différents rendements sont 25.19% et 29.76% respectivement.

En plus de leurs rendements, l'extrait aqueux chaud de poivre noir étudiée possède des effets antifongiques très élevés même à la faible concentration. Par contre l'extrait aqueux froid de poivre noir possède des effets antifongiques relativement faibles.

Sur le plan phytochimique, les résultats montrent que les extraits aqueux froid et chaud de poivre noir est un composé riche en métabolites secondaires ; Stéroïdes, Tannins, Flavonoïdes, Saponines et montre l'absence d'Anthocyanes, alcaloïdes. Ces substances jouent un rôle déterminant dans l'activité antifongique.

Concernent l'activité antifongique, les extraits aqueux chaud et froid de poivre noir s'avérées en général efficaces sur la souche étudiée *A. Ochraceus*, notamment avec les plus hautes concentrations.

En effet, les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux chaud est plus efficace en comparaison avec celui froid. L'espèce la plus sensible par l'extrait aqueux chaud est *A. Ochraceus*. L'activité antifongique croit au fur à mesure dès que la concentration augmente de l'extrait cela l'induit à la diminution de la vitesse et la croissance mycélienne en diminuant les diamètres et les tailles de mycélium par rapport au témoin.

Enfin, les résultats obtenus indiquent que l'extrait aqueux chaud possède une bonne activité antifongique et pourrait être ainsi considéré comme une alternatif aux fongicides chimiques synthétique très prometteur pour les structures de stockage de blé dur et de réduire la croissance mycélienne responsable de l'altération de blé dur stocké.

Ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies comme :

- Tester l'activité antifongique des extraits aqueux chaud et froid de poivre noir sur d'autres souches fongiques contaminants le blé dur stocké.

- Extraction des huiles essentielles du poivre noir et évaluation de leur pouvoir antifongique sur les mêmes souches testées pour les extraits aqueux.
- Tester le pouvoir antifongique des extraits aqueux obtenus sur terrain.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- 1. Abdelghani, Weaver, Zidan, Hussein, Keevil et Brown, 2008:** Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 518-522.
- 2. Ahmad N., Hina Faza., Bilal Haider Abbasi., Shahid Farooq., Mohammad Ali1., Mubarak Ali Khan., 2012** - Biological role of Piper nigrum L. (Black pepper): A review.the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. P 1945-1953.
- 3. Aidani H,2015.***Effet des attaques de Capucin des grains (Rhizopertha dominica) sur les céréales stockées. « Estimation sur la perte pondérale et le pouvoir germinatif Cas de blé dur dans la région de Tlemcen ».*
- 4. Akinsanmi O.A., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhouse D. et Chakraborty S.2004.** Identity and pathogenicity of *Fusarium spp* isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research* 55, 97-107.
- 5. Amadi J.E, Adeleke E.E., Olan G., Garuba T. Adebola M.O.,2014.** effect of plant extracts on sporulation and spore germination of stored melon seed fungi. *international journal of research –granthaalayah* P 21-29
- 6. Ayyad W A., 2014-** Alkaloids and Phenolic Compound Activity of Piper Nigrum against Some Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicine and Biotechnology*, 2014, Vol. 2, No. 1, 20-28).
- 7. Bajji, M., 1999.** Étude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur : caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance à la sécheresse et de variants somaclonaux sélectionnés In vitro. Thèse de doctorat. Univ Louvain.
- 8. Bajpai V.K. and Kang S.C., 2010.** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 87 : pp. 327-336.
- 9. Bassou K .2007.** Efficacités antibactériennes et antifongues des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* L'issue de la région de ouargla sur quelque germe pathogène : *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Etude supérieures, Université de Kasdi Merbah Ouargla. 69.

10. **Belaid D. (1996).** Aspect de la céréaliculture, Algérien. *Office des publications universitaires. Alger.* 208p
11. **Benattia et Bettayeb, 2015 :** Evaluation effet allélochimique des extraits aqueux et huile essentielle d'*Artemisia Compestris L.* sur quelques souches de *fusarium* p 49.
12. **Benouaer, 2016.** L'activité antifongique des extraits aqueux et des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* sur des champignons potentiellement mycotoxigéniques du blé dur (*Triticum durum* var VITRON).P(44).
13. **Bonjean A., Picard E., 1991-** Les céréales à paille. Origine-histoire-économie-sélection. Ligugé ; Poitiers : *Aubin imprimeur.* 36p.
14. **Botrel A., Bloch J., Biaujeaud M., Ringuet J., Ybert E., Delesallefeat T., Vican P., De la roque R., De la roque O., 2001-** encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larouse/VUEF. 21. Paris.335p
15. **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3eme Ed, Tec &Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.
16. **Cheng S.S., Liu J-Y., Hsui Y-R. and Chang S-T., 2006.** Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology* 97: pp. 306–312.
17. **Debiton, 2010.** Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. *Thèse de doctorant en Physiologie et génétique moléculaire.* P 12, 13,16.
18. **Dechambre, A., 1874.** Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales. Tome Neuvième. Paris p : 625.
19. **Djaneb Camara Kouadio Bene, Goueh Gnahoue, N'guessan Bra Yvette Fofie, Guede NOËL Zirihi., 2016.** Etude Ethnobotanique, Evaluation De L'activite Antifongique Sur *Candida Albicans* Et De La Toxicite Sur Des Cellules Hff De *Bersama Abyssinica* (Fresen.), Une Plante De La Pharmacopee Ivoirienne *European Scientific Journal* January 2016 edition vol.12, No.3 ISSN : 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431p
20. **Djermoun, A., 2009.** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Nature et Technologie*

- 21. Doumaindji A., Doumaindji S., Doumaindji B., 2003.** Cours de technologie des céréales. Ed. Office des publications Universitaires Ben-Aknoun-Alger ; pp 01-20.
- 22. Erroux J. (1974).** Agronomie méditerranéenne .1. Le milieu méditerranéen et ses problèmes. La culture vivrière en Algérie.387p.
- 23. Feillet, P., 2000.** Le grain de blé : Composition et utilisation INRA. Paris : p 312.
- 24. Jacqueline PHAM ,2007,***Piper nigrum* L : aspects botaniques, chimiques et pharmacologiques. Thèse de Docteur en Pharmacie, Université de Nantes.
- 25. Gill, L.S., 1992.**Ethnomedicinal Uses of Plants in Nigeria. University of Benin Press, Benin. 276 PP.
- 26. Giordani., Hadeb., Kaloustian., 2008-** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79. P 199-203.
- 27. Goumni et Salhi, 2013.**Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extrait de la plante *Laurus Nobilis* L. Université de kasdi Merbah Ouaregla. P : 18.
- 28. Kemassi et Azouzi, 2017.**Etude de la potentialité antifongique de l'extrait aqueux d'*Asphodelus tenuifolius* sur quelques champignons des céréales. P
- 29. Karumi, Y., Onyeyili, P.A. & Ogugbuaja, V.O., 2004.** Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* **4**, 179-182.
- 30. Khan A., Qureshi R., Ullah F., Gilani S., Nosheen A., Sahreen S., Laghari M K., Laghari M Y., Rehman S., Hussain I., Murad W., 2011.** Phytochemicals analysis of selected medicinal plant of Margalla Hills and surroundings. *Jornal of medicinal plants research*, Vol 5 (25) : 6017-6023.
- 31. Khelifi M,2013.** Etude des différents aspects de conservation des céréales et mesures des protection pratiqués au niveau de CCLS de Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen
- 32. Koffi, N., Beugré, K., Guédé, N., Zirihi, D. & Laurent, A., 2009.**Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en paysKrobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* **6 (1)**, 1-15.
- 33. Kordali S., Cakir A., Zengin H.& Duru M. E.,2003.** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*. 74,164-167.

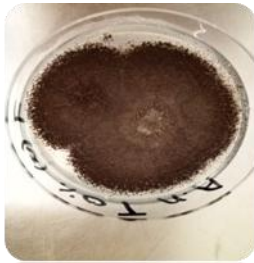
- 34. Mills, J.T., 1990.** Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 68, 982-986.
- 35. Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N. et Vahidipour, H.R., 2003.** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82.
- 36. Mohammedi Z, 2005.** Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Magistère. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. P : 105.
- 37. Mohammedi, 2013 :** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. P 84
- 38. Molinié A., Faucet V., Castegnaro M., Pfohl-leszkowicz A., 2005.** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry* 92,391-400.
- 39. Mouria. B, Ouazzani-Touhami. A, Douira. A., 2013.** *Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, B.P 133, Kénitra, Maroc*
- 40. Multon, J.L., 1982.** Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits dérivés ; Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 576.
- 41. Oloyede, O.I., 2005.** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*, *Pakistan journal of nutrition* 4, 379-381.
- 42. Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z ET Nalhdibadi H., 2007.** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18, 1518-1523.
- 43. Osman, K. A. Et Abdulrahman, H.T., 2003.** Risk Assessment of Pesticide to Human and the Environment, *Saudi J. Biol. Sci.*, 10, P 81-106.

- 44. Ouanary S, 2012**, Etude comparative de l'effet du semis direct et du labour conventionnel sur le comportement du blé dur (*Triticum durum* Desf.), Thèse de Magister Production Végétale et Agriculture de Conservation. Univ Ferhat Abbas Setif. P :03.
- 45. PITT J. I., 1973**. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Noveltaxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* 65: 1135-1157.
- 46. RAMIREZ C., 1982**. Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press,Amsterdam:P 231-236
- 47. Razak, M.F., Aidoo, K.E., Candlish, A.G., 2009**. Mixed herbs drugs inhibitory. effect on growth of the endogenous mycfllore and afataxion production *Mycopathologie* p: 167-273-26.
- 48. Rocher, F 2004**, lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense.Théses de docteur de l'université de poitiers
- 49. Sadipo O A., Akanji m A., Kolawole F B et Odutuga A., 1991**.Saponin is the active antifungal principle in *Garcinia Kola*, heckle seed, *Biosci. Res. Commun* 3, 171.
- 50. Serghat, A. Mouria, A. Ouazzani Touhami, A. Badoc, A. Douira., 2004**. Effet de quelques fongicides sur le développement *in vitro* de *pyriculariosegriseet helminthosporium coryza* *Les fongicides tricyclazole, thiabendazole, méthylthiophanate Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2004, **143**, P 7-18
- 51.Shiva Rani S K, Neeti Saxena et Udaysree. 2013**. Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Global Journal of Pharmacology* 7 (1): 87-90, 2013 ISSN 1992-0075
- 52.Singh G., Maurya S., de Lampasona M.P. and Catalan C., 2006**. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, Vol. 17, pp.745–752.
- 53. Smith, S.J., Hui, Y.H., 2004**. Food processing: Principles and Application. Blackwell Publishing; 524 P.
- 54. Surget, A., et Barron, C., 2005**. Histologie du grain de blé, *Industrie des céréales* 145, 4-7.

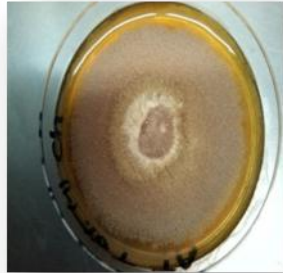


Annexes

Annexe I : Les souches fongiques testées



A.niger



A.terreus



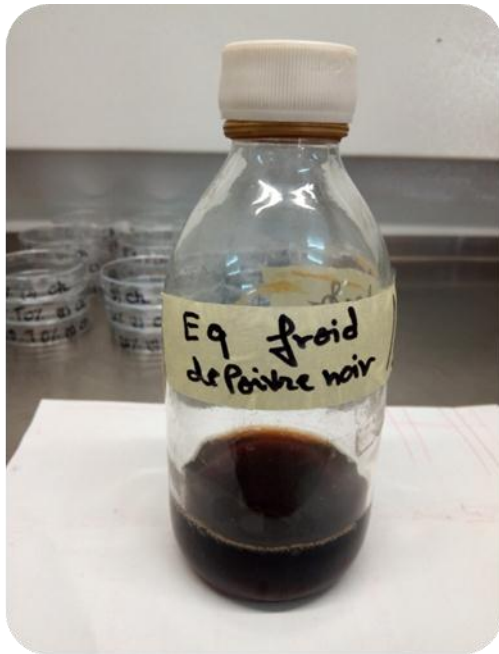
A.ochraceus

AnnexeII :Filtration de l'extrait aqueux par micro filtre

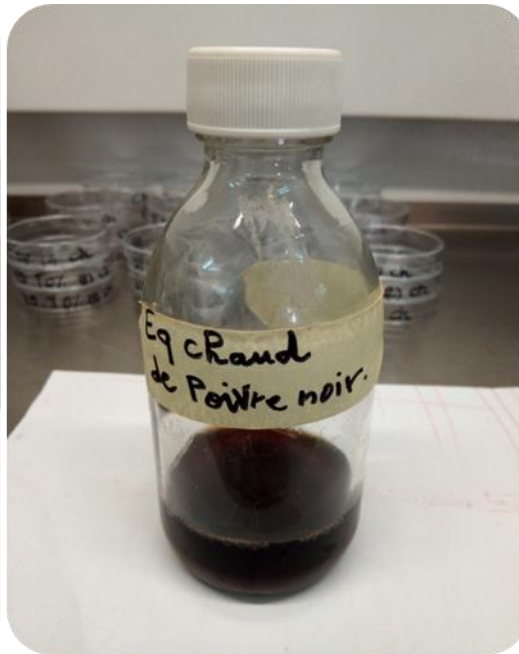


Filtration de l'extrait aqueux par micro filtre

Annexe III : Les flacons des extraits aqueux chaud et froid


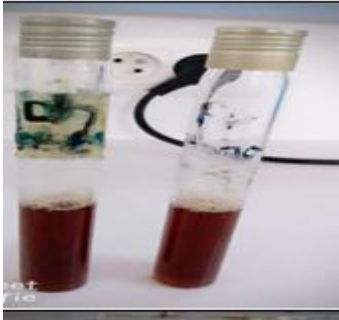




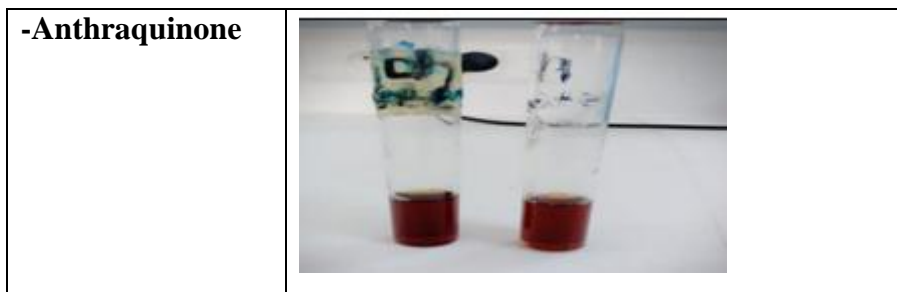
Extrait aqueux froid de poivre noir



Extrait aqueux chaud de poivre

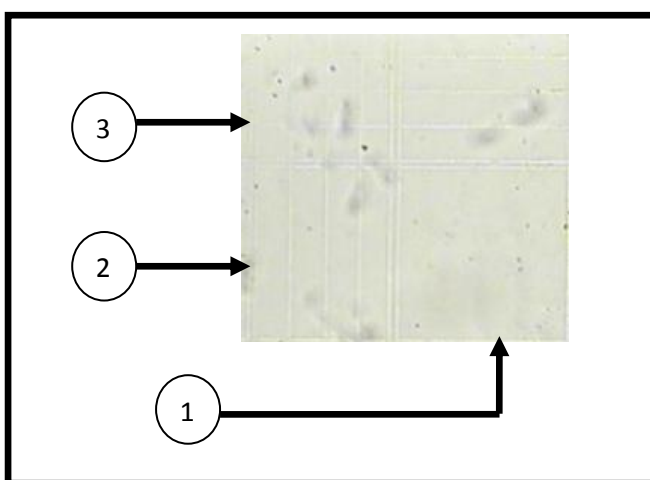
Annexe III : Tests phytochimiques

Groupe chimique	Extrait aqueux (Froid et chaud)
Tannins	
Saponosides	
Stéroïdes	
-Flavonoïdes	



Annexe IV : Inhibition de la sporulation

1- Le choix de cadrage de calcul




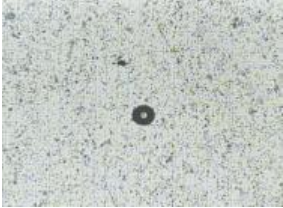










Pour calculer la concentration sporale, on choisit la cadrage Si le nombre des spores dans les rectangles :

1. Inférieure a 5 spores ont utilisé 10 grandes cadres
2. Entre 5 et 40 spores ont utilisé 10 rectangles
3. Supérieure 40 spores ont utilisé 10 petites cadres







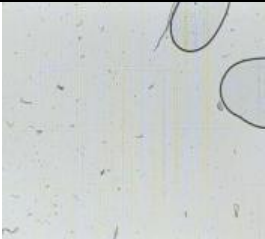


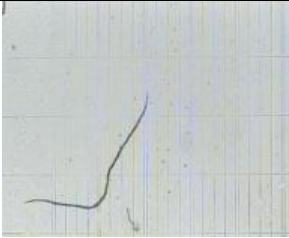
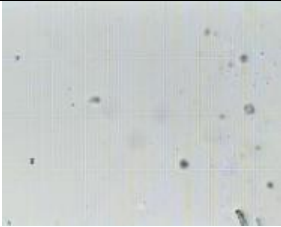

Puis on fait la moyenne de 10 mesures. Utilisé la relation pour chaque cadrage

1. Si on a utilisé le grand cadre, la concentration sporale est la moyenne de spore x 2.5×10^5
2. Si on a utilisé le rectangle, la concentration sporale est la moyenne de spore x 10^6
3. Si on a utilisé le petit cadre, la concentration sporale est la moyenne de spore x 4×10^6

2-production des spores d'extrait aqueux froid :

Espèce	0%	20%	25%	30%
<i>A.niger</i>				
<i>A.terreus</i>				
<i>A.Ochraceus</i>				

3-production des spores d'extrait aqueux chaud :

Espèce	0%	20%	25%	30%
<i>A.niger</i>				
<i>A.terreus</i>				
<i>A.Ochraceus</i>				

Résumé :

Etude de l'activité antifongique des extraits aqueux « froid » et « chaud » de poivre noir sur quelques moisissures contaminants le blé dur stocké.

Notre travail vise à étudier l'activité antifongique de diverses concentrations (0, 20, 25 et 30%) des extraits aqueux chaud et froid de poivre noir « *piper nigrum* » sur quelques moisissures contaminants le blé dur stockées. Les extraits aqueux ont été préparés par la méthode de macération avec agitation. Les rendements d'extraction obtenus sont 25.19 % pour l'extrait aqueux froid et 29.76% pour l'extrait aqueux chaud. En effet, les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux chaud est plus efficace en comparaison avec celui froid. L'espèce la plus sensible par l'extrait aqueux chaud en utilisant la concentration maximale d'extrait 30% est *A. ochraceus* avec un taux d'inhibition de croissance estimé à 90,56 %, suivi par *A. niger* à 86.15 % et *A. terreus* à 84.23%.

Les tests phytochimiques effectués pour détecter les différents groupes des composés chimiques contenus dans les extraits aqueux froid et chaud ont révélé la présence de : stéroïdes, tannins, flavonoïdes, saponines et l'absence d'Anthocyanes, alcaloïdes. Ces substances jouent un rôle déterminant dans l'activité antifongique.

Mots clés : Extrait aqueux, *Piper nigrum*, tests phytochimiques, blé dur, activité antifongique, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*.

المخلص:

دراسة النشاط المضاد الفطري للمستخلصات المائية "الباردة" و "الساخنة" من الفلفل الأسود على بعض الفطريات الملوثة للقمح الصلب المخزن.

الهدف من دراستنا هو تقييم نشاط مضاد الفطريات لتراكيز مختلفة (0، 20، 25 و30٪) للمستخلصات المائية الساخنة والباردة للفلفل الأسود على بعض الملوّثات الفطرية للقمح الصلب لأجل استخدامها كحافظ غذائي. تم تحضير المستخلصات المائية عن طريق النقع والخلط، أما المردود المتحصل عليه من هذه العملية للمستخلص المائي البارد هو 25.19% أما للمستخلص المائي الساخن هو 29.76%. في الواقع، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلص المائي الساخن أكثر فعالية بالمقارنة مع البارد. أكثر الأنواع حساسية هو *A. ochraceus* بالمستخلص المائي الساخن باستخدام أقصى تركيز 30٪ هو مع معدل تثبيط نمو يقدر بـ 90.56٪، يليه *A. niger* عند 86.15٪ و *A. terreus* عند 84.23٪. كما ركز عملنا أيضا على دراسة الاختبار الكيميائي لأجل التعرف على المركبات الكيميائية الموجودة في المستخلص المائي البارد والساخن لنبات الفلفل الأسود، حيث تبين وجود كل من المركبات التالية: القلوبيدات، الفلافونويد، التينينات، الستيرويد، الصابونين وغياب الانثوسيانين، قلويدات. هذه المواد تلعب دورا حاسما في نشاط مضاد للفطريات.

الكلمات المفتاحية: مستخلص مائي، *Piper nigrum*، اختبارات كيميائية نباتية، قمح الصلب، نشاط مضاد للفطريات، *A. ochraceus*، *A. niger*، *A. terreus*.

Abstract:

The antifungal activity of the "cold" and "hot" aqueous extracts of black pepper on some contaminating molds stored durum wheat

Our work aims to study the antifungal activity of various concentrations (0, 20, 25 and 30%) of the hot and cold aqueous extracts of the black pepper spice "*piper nigrum*" on some stored hard wheat contaminants.

The aqueous extracts were prepared by the maceration method with stirring. The extraction yields obtained are 25.19% for the cold aqueous extract and 29.76% for the hot aqueous extract. Indeed, the results obtained showed that the hot aqueous extract is more effective in comparison with the cold one. The most sensitive species by the hot aqueous extract using the maximum concentration of 30% extract is *A. ochraceus* with an estimated growth inhibition rate of 90.56%, followed by *A. niger* at 86.15% and *A. terreus* at 84.23%.

Phytochemical tests carried out to detect the different groups of chemical compounds contained in the cold and hot aqueous extracts revealed the presence of: steroids, tannins, flavonoids, saponins and the absence of anthocyanins, alkaloids. These substances play a determining role in antifungal activity.

Key words: Aqueous extract, *Piper nigrum*, phytochemical tests, durum wheat, antifungal activity, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*.