UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologique

Mémoire de fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Mme HABBI Oumelkhair

M me KHELFAOUI Houda

Thème

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

Soutenu publiquement

Le : 04-10-2018

Devant le jury :

Présidente	**Mme. BEN AISSA Atika**	**M.C.A (U.K.M.Ouargla)**
Examinatrice	**Mme. SOUIDE Wafa**	**M.A.A (U.K.M.Ouargla)**
Promotrice	**Mme. DJERBAOUI Amina Nesrine**	**M.C.B (U.K.M.Ouargla)**
CO- Promotrice	**Mme OULD EL HADJ-KHELIL Aminata.**	**Prof (U.K.M. Ouargla)**

***Année Universitaire* : 2017/2018**

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
A.niger	*Aspergillus niger*
A.terreus	*Aspergillus terreus*
A.ochraceus	*Aspergillus ochraceus*
CDA	Czapek sucrose agar
Cm	Centimeter
CYA	Czapek yeast Agar
CZ	Czapekconcentré
Eq	Extrait aqueux
G25N	Glycérol nitrate agar
MEA	Malt extract agar
Ms	Milli siemens
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	Classification botanique du blé dur	4
02	Valeurs nutritionnelles	10
03	Les caractères physiques des extraits aqueux froid et chaud de *noix de muscade*	24
04	Teste phytochimiques des extraits aqueux froid et chaud de *noix de muscade*	24
05	Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur les souches testées	25
06	Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur les souches testées	33

Liste des Figures

Figure	Titre de Figure	Page
01	**Figure 01 :** Structure histologique du grain de blé à maturité (Surget et Barron, 2005**).**	2
02	**Figure 02 : Grains de** *Myristica fragrans*	9
03	**Figure 03 : Grains de** *Myristica fragrans*	12
04	**Figure 04 :** Etapes de la préparation d'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans*.	14
05	**Figure 05** : Préparation des différentes concentrations des extraits aqueux	18
06	**Figure 06 :** Protocole expérimentale des différentes concentrations des extraits aqueux de *Myristica fragrans* ***(A.niger ; A.ochraceus ; A.terreus)***	19
07	**Figure 07 :les étapes expérimentale de la méthode de contact direct de** *Myristica fragrans*	20

08	**Figure 08**: Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction du temps et concentration d'extrait aqueux	27
09	**Figure 09**:Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux froid de *Myristica fragrans.*	28
10	**Figure10** : Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux froid de *Myristica fragrans*	29
11	**Figure 11 :** Taux d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait aqueux froid de *Myristica fragrans.*	30
12	**Figure12** : Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.	31
13	**Figure13** : Inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.	32
14	**Figure 14** : Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction de temps et concentration d'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans.*	34
15	**Figure15** :Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux chaud de *Myristica fragrans.*	35
16	**Figure 16** : Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans.*	36
17	**Figure 17 :** Taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud	37
18	**Figure 18 :** Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration	38
19	**Figure 19 :** Taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud	39

Liste des annexes

Annexe 01	L'aspect des souches fongique testé	**48**
Annexe 02	**composition du milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) ,Eau physiologique et Suspension sporale**	49
Annexe 03	**Inhibition de la sporulation**	49

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction.....1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Généralité sur le blè dur.....2

I.1.1. Historique de blé dur 2

I.1.2. Structure des grains de blé.....2

I.1.3. Etude botanique. 3

I.1. 4. Description de blé dur(*triticum durum*) :.....4

I. 1. 5.Classification du blé dur 4

I. 1.6. Stockage du blé.....5

I. 1.6.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie 5

I. 1. 6.2. Stockage du blé en silos.....6

I. 1. 7. Facteurs d'altération du blé 6

I. 1. 7.1. Altération d'origine environnementale.....6

I. 1. 7.2. Altérations enzymatiques 6

I. 1. 7.3. Altération d'origine mécanique ou physique.....7

I. 1. 7.4 . Altération d'origine biologique 7

I. 1. 8. Flore microbienne du blé.....7

I. 1. 8. 1. Moisissures 7

I. 1. 8.2. Levures 8

I. 1. 8. 3. Bactéries 9

I.2.La noix de muscade(*Myristica fragans)* 9

I.2.1.Définition.....9

I.2.2.Classification de Noix de muscade.....10

I.2.3. L'Utilisation de noix de muscade 10

I.2.4.Valeurs nutritionnelles.....11

I.2.5. Stockage.....11

I.2.6. Santé 12

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. Matériel et méthodes 13

II.1. Matériel biologique 13

II.1.1. noix de muscade *« Myristica fragrans»* 13

II. 2. Matériel fongique 13

II. 3. Préparation des extraits aqueux.....14

II.3.1. Séchage des plantes.....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

III.3.6. Détermination du rendement des extraits secs.....16

II.4. Tests phytochimiques.....16

II.4.1. Détection des polyphénols 16

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 20

II.6. Paramètres étudiés.....21

II.6.1. Croissance radiale 22

II.6.2. Test production de spore **.....23**

II.6.3.Test germination de spore 23

II.7. Analyse statistique.....24

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats.....25

III.1.1. Caractères physiques des extraits aqueux chaud et froid.....25

III.1.2.Tests phytochimiques.....25

III.2. Activité Antifongique 26

III.2.1. Activité antifongique des extraits aqueux.....26

III.2.1.1.Extrait aqueux froid 26

III.2.1.2. Extrait aqueux chaud.....34

III.3. Discussion 40

Conclusion 43

Références bibliographiques.....44

Annexes.....49

Remerciements

Le présent travail est réalisé au laboratoire de l'université de Ouargla.
Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nos avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

On commence par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à notre encadreur ***Mme DJARBAOUI Amina Nesrine*** *maitre assistante qui nous a honorées en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, merci de nous avoir guidées avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, on exprime notre respect et notre gratitude.*

On adresse nos sincères remerciements à notre Co- encadreur ***Mme OUELD EL HADJ-KHELIL A,*** *Professeur au Département des Sciences Biologique Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Ouargla.*

Sans oublier ***Melle SALHI Nesrine****, Maîtres de Conférences au Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Ouargla, pour leurs conseils et leurs aides.*

Nous avoir fait l'honneur d'être Examinateur et de participer au

Jury de ce mémoire avec ***Mme. BEN AISSA Atika*** *présidant et* ***Mme SOUIDE Wafa*** *examinateur.*

Nous avoir remerciements aussi ***Mme karima*** *et* ***Mme chouaiba*** *travailleur au laboratoire de l'université de Ouargla pour leurs conseils et leurs aides.*

Enfin, nos remerciements les plus sincères s'adressent aux nombreuses personnes avec les quelles nous avons eu l'occasion de travailler et à tous ce qui nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Merci

Dédicacs

Je dédie ce travail en premier lieu,

A mes parents pour leurs amours, leurs encouragements et leurs sacrifices pendant toute ma vie car aucun mot ne pourra exprimer ma haute gratitude et profonde affection. Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement durant toutes mes études.

A mes chers frères : Mohamed, Abde elhamide ; Ali et Bachir ; et ma sœur Souad. Et ma grand-mère.

A mon mariée Lakhdar et sa famille.

Je voudrai remercier aussi tous les membres de ma famille. Qui m'ont toujours soutenu et encouragé pour réaliser ce modeste travail.

A tous mes amis, je cite particulièrement : Imane, Houda, Ilham ; Aicha ; Samia, Saadia et mon binôme Houda.

Je remercier tous ceux qui m'avaient aidée d'une façon ou d'une autre, ou encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire, qui était, pour moi, une expérience inoubliable et enrichissante.

Oum Elkhair

Dédicacs

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 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 mon marie Mohamed et sa famille.

A ma fille meniar.

A mes chers frères : Ahmed eltijani, khlil, Hocien Mohammed elsadok

A mes chères sœurs : Fatima, Aya. A tous mes oncles et à mes tantes et ses enfants

A tout ma famille Khelfaoui ; A ma binôme Oum elkhair qui a fait son travail par excellence. Je dédie également à tous mes amies surtout Sabrina, Aicha et Ilham.

A tous mes amies à l'Université Kasdi Merbah A tous ceux qui me sont chères. A tous ceux qui m'aiment. A tous ceux que j'aime.

HOUDA.

Introduction

Les céréales, depuis toujours, constituent la principale ressource alimentaire de l'Homme et de l'animal et possèdent un pouvoir nutritionnel important. Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage **(Pfohl-lfszkowicz, 1999).**

Les céréales peuvent être contaminé par nombreux pathogènes fongique, 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. La sécrétion des métabolites secondaires hautement toxiques, par les champignons sur les céréales stockées, constitue un danger réel pour la sécurité sanitaire de l'Homme et de l'animal.

Les 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).**

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 Noix de muscade et la recherche de leurs effets antifongiques sur des souches fongiques potentiellement toxinogène isolées à partir du blé dur stocké.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail à savoir l'étude de Noix de muscade (*Myristica fragrans*) 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 , 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 dur

I.1.1. Historique de blé dur

La culture des céréales a constitué l'une des premières activités agricoles, donc elle a permis l'essor des grandes civilisations. Le nomadisme a progressivement laissé la place à la sédentarité qui permit la culture des céréales. Le blé est l'une de ces céréales connues depuis l'antiquité. Sa culture remontée au mésolithique vers 7000 avant Jésus-Christ. Le blé dur provient des territoires de la Turquie, de la Syrie, de l'Iraq et de l'Iran.

Le terme blé vient probablement du gaulois blato (à l'origine du vieux français blaie, blee, blaier, blaver, d'où le verbe emblaver, qui signifie ensemencer en blé) et désigne les grains qui broyés, fournissant de la farine, pour des bouillies *(polenta),* des crêpes ou du pain.

C'est en l'an 300 ans avant JC, que les premiers procédés de panification ont été élaborés par les Egyptiens qui préparaient déjà les premières galettes à base de blé. Par la suite, les techniques de panifications se sont améliorées grâce au Hébreux, Grecs et enfin Romains qui en répandent l'usage à travers l'Europe et devenue, un des constituant essentiel de l'alimentation humaine. **(Nedjah.2015)**

I.1.2. Structure des grains de blé

Physiologiquement, le grain des *Poacées* est un caryopse blanc ou roux, ovoïde, pesant de 35 à 45 mg (le grain est soudé aux parois de l'ovaire) jouant le rôle d'un fruit renferment une graine, (cotylédon qui représente 82 à 85% du grain) (**Godon, 1991**).

L'espèce *Triticum durum* est composée de trois parties essentielles (l'enveloppe, l'amande farineuse et le germe). Chacune de ces parties est formée de réseaux très complexes qui font encore l'objet de nombreuses recherches (**Cheftel *et al.*, 1977**). Le germe qui donne la plantule, l'amande appelée endosperme ou albumen, tissu de stockage qui fournit au germe les réserves nécessaires pour sa croissance et les enveloppes protectrices sont composées par la paroi de la graine (testa) et par la paroi du fruit (péricarpe) (**Doumandji *et al*., 2003**).

La figure 01 illustre les différentes parties composant une graine de blé.

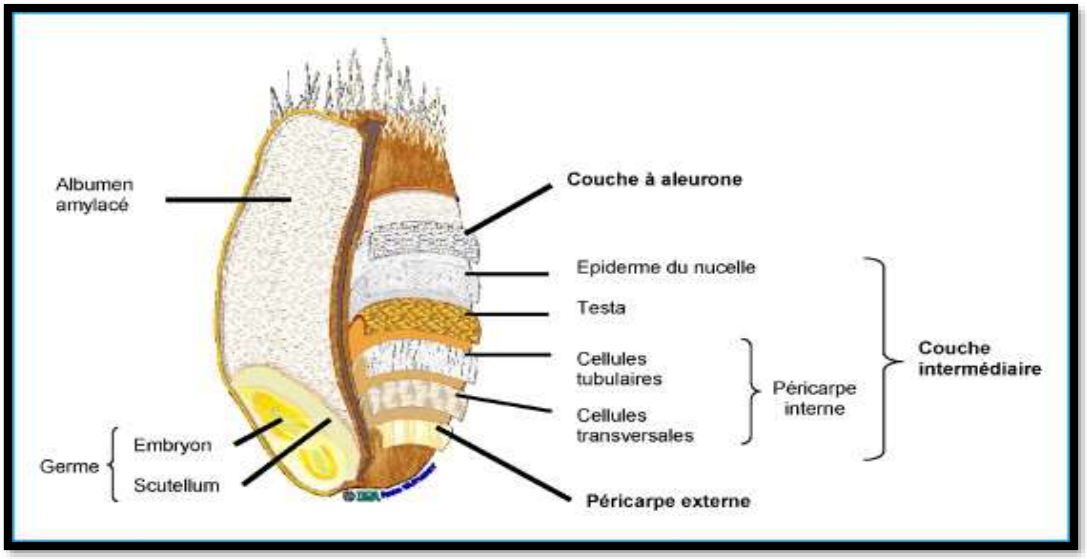


Figure 01 : Structure histologique du grain de blé à maturité (Surget et Barron, 2005**).**

I.1.3. Etude botanique.

1. Place dans la classification botanique.

Le blé dur appartient au genre Triticum et à l'espèce durum (Desfontaines). 11 fait donc partie du groupe des espèces tétraploïdes (2 n = 28).

2. Caractéristiques générale

D'une façon générale, le blé dur se caractérise par :

- Un épi à rachis solide, à glumes carénées jusqu'à leur base, à glumelle inférieure terminée par une longue barbe colorée ;
- Un grain très gros (45-60 mg), de section subtriangulaire, très riche en albumen, de texture vitreuse ;
- Un appareil végétatif à tallage faible (souvent un seul épi par plante), à chaume long et souple, sensible à la verse.

3. Caractéristiques culturales.

Les variétés actuelles se caractérisent par :

- Un rythme de développement « printemps » à « semi-alternatif ».
- Une grande sensibilité au froid, interdisant leur semis d'automne en zone nord.
- Un tallage.
- Épis assez faible.
- Une résistance à la verse généralement médiocre.

- Une grande sensibilité au piétin-verse, à la fusariose, et une certaine sensibilité aux rouilles jaune et brune.

4. Origine génétique du blé dur.

Ces espèces (*Triticum* tétraploïdes*)* sont des amphidiploïdes entre un *Triticum* diploïde *(Tr. beoticum* ou *Tr. monococcum)* apportant le génome A et *Ægilops speltoïdes* apportant le génome **B.** Une telle hybridation aurait donné naissance au *Tr. dicoccotdes* qui se serait ensuite diversifié *en Tr. dicoccum et Tr. durum.* L'origine de l'hybride des *Triticum* tétraploïdes ont démontré par **(Riley et chapman** (1957)).

I.1. 4. Description de blé dur (*triticum durum*) :

Le blé dur (triticum **durum)** est une plante annuelle de la classe des monocotylédones de la famille des poaceae, de la tribu des Triticée et du genre **triticum.**

En terme de production comerciale et d'alimentation humaine, cette espèce est la dexieme plus importante du genre **triticum** après le blé tendre. Leur famille compend 600 genres et plus de 5000 espéces **(Feillet ,2000).**

Le blé appartient à la famille des graminées (Gramineae = Poaceae), qui comprend plus 10000 espèces différentes (**Mac Key, 2005**). Plusieurs espèces de ploïdie différentes sont regroupées dans le genre *Triticum* qui est un exemple classique d'allo polyploïdie, dont les génomes homéologues dérivent de l'hybridation inter espèces appartenant à la même famille (**Levy et Feldman, 2002**). Le Blé dur (*T. turgidum ssp. durum* Desf.) est un allo tétraploïde (2n = 28, AABB) qui a pour origine l'hybridation suivie d'un doublement chromosomique entre *Triticum Urartu* (génome AA) et une espèce voisine, *Aegilops speltoides* (génome BB) (**Huang *et al.*, 2002**).

I. 1. 5.Classification du blé dur

La plupart des céréales, herbacée, annuelle, monocotylédone, appartiennent à la famille des Graminées et/ou Poacées, parmi les genres de cette famille : le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le maïs, le riz, le millet, le sorgho. Les unes appartiennent à la sous-famille des Festucoïdées :

Blé, orge, avoine, seigle ; les autres à la sous-famille des Panicoïdées: maïs, riz, sorgho, millet.

Le blé dur est une céréale autogame appartenant à l'ordre des Graminnales et/ou Poales, famille des Graminae et/ou Poaceae **(Rudolphe, 2001).** Une classification détaillée est donnée par le tableau ci-dessous

Classification des Triticum :

Taxonomie et classification des Triticum (Fiellet ,2000) :

Tableau 1 : Classification botanique du blé dur

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Commélimiflorales
Sous ordre	Poales
Famille	Graminae ou Poaceae
Genre et espèce	*Triticum durum*

I. 1.6. Stockage du blé

La consommation quotidienne est assurée par une seule récolte, quelquefois deux dans l'année d'où la nécessité du stockage. En outre, les grains stockés sont utilisés comme des semences en attendant la saison suivante **(Druvefors, 2004).** Plus l'humidité des grains est importante à la récolte, plus les conditions sont favorables au développement des microorganismes. De bonnes pratiques de conservation consistent à éviter son altération en contrôlant les principaux facteurs de détérioration **(Molinie *et al*., 2005)**.

Autrement dit, le but des technologies de conservation est de préserver par des moyens appropriés l'intégrité des principales qualités des graines qui ne peuvent pas être améliorées pendant le stockage **(Chawla, 1984)**.Les premiers systèmes de stockage étaient de grands paniers faits de roseaux ou fioles d'argiles qui sont enfoncées dans le sol, ainsi que des puits, des structures de bois et des puits garnis de paille **(Druvefors, 2004)**.

I. 1.6.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie

Le paysan algérien, sur les hauts plateaux, conservait surtout le produit de ses champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées dans un sol argileux ; c'est ce qu'on appelle « El matmour » ou dans des sacs en toile de jute, entreposés dans divers locaux, magasins ou hangars. La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les

inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes **(Doumandji *et al*., 2003).**

I. 1. 6.2. Stockage du blé en silos

De nos jours, les silos permettent de stocker les différents types de céréales en même temps ; il s'agit de multi-produits **(Duron, 1999)**. Ce sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal inoxydable. L'emploi des silos réduit la main d'oeuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux **(Doumandji *et al*., 2003).**

I. 1. 7. Facteurs d'altération du blé

I. 1. 7.1. Altération d'origine environnementale

• L'humidité

La faible teneur en humidité est le facteur le plus important pour la conservation des grains lors du stockage. Les grains, stockés avec le contenu d'humidité élevé, sont soumis à des pertes élevées causées par l'attaque des insectes et des champignons **(Vasquez *et al*.,2008).** Elle favorise la respiration des grains et accentue en conséquence le dégagement de chaleur au sein des grains stockés **(Cruz *et al*.,2002).**

• La température

La température joue un rôle important dans la conservation des grains **(Cruz *et al*., 2002).** Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité du grain au cours de stockage **(Kusinska, 2001).** Elle intervient d'une part sur la valeur de l'Aw et d'autre part sur les vitesses de réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes **(Richard-Molard, 1998).** Au cours de la conservation, plus la température est élevée plus les réactions biologiques des microorganismes sont rapides **(Multon,1982).**

I. 1. 7.2. Altérations enzymatiques

Les altérations enzymatiques dues aux enzymes propres aux grains se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies **(Multon, 1982).** C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxygénase. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation **(Afnor, 1986).** Les réactions de Maillard donnent aussi un grand nombre de composés intermédiaires (dont l'activité physiologique a été reconnue) aboutissant dans leur stade

ultime à la formation de composés brunâtres avec une destruction des vitamines B1, E et les caroténoïdes **(Afnor, 1986).**

I. 1. 7.3. Altération d'origine mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entrainant des cassures et favorisant les autres causes d'altération. L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques **(Afnor, 1986).**

I. 1. 7.4. Altération d'origine biologique

Un lot de grains entreposé comporte inévitablement au moins deux entités vivantes : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) **(Multon, 1982).**

La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique **(Magan *et al*., 2003).** Les virus paraissent négligeables, et les lichens sont parmi les rares organismes vivants capables de supporter sans dommage une grande siccité : leurs teneurs en eau se situent entre 5 et 40%, contre 75 à 97% pour le reste du monde vivant **(Multon, 1982).**

I. 1. 8. Flore microbienne du blé

Elle accompagne normalement les grains sains, Celle qui se développe au cours du stockage se caractérise par la succession de deux types écologiques : de nouvelles espèces dites de stockage, prenant l' avantage sur les espèces champêtres **(Feillet, 2000).**

I. 1. 8. 1. Moisissures

a) Flore des champs

Les grains de blé sont contaminés par les microorganismes dans le champ, et cette microflore est dominée par des moisissures **(Deàk, 2008).** Les spores des champignons de champ envahissent les grains et croissent dans le champ ou attendent le battage **(Dendy et Dobraszczyk, 2000).** Les genres rencontrés sont : Alternaria (le plus fréquent), Fusarium, Cladosporium, Epicoccum et Helminthosporium (moins fréquents), Chaetomium, Curvularia, Rhizopus et Stemphylium **(Sauer et al., 1982 ; Zillinsky, 1983).** Cette flore est bien adaptée à des changements rapides des conditions

dans le champ. Elle exige des activités en eau relativement élevées pour une croissance optimale **(Adams et Moss, 2008)**. En fonction des conditions précises, ces champignons peuvent mourir lentement au cours du stockage ou peuvent survivre pendant de longues périodes. La survie est plus longue à basse température et à faibles niveaux d' humidité **(Roberts, 2005).**

b) Flore intermédiaire

Elle est une catégorie à comportement plus diversifié et regroupe des germes capables d'un développement limité, en début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Les genres les plus rencontrés sont : Cladosporium, Rhizopus, Absidia et Mucor **(Godon et Loisel, 1997).**

c) Flore de stockage

Les moisissures des grains de blé stockés sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés. Les principaux genres rencontrés sont : Aspergillus et Penicillium en raison de leurs capacités de se développer sur tous substrats possibles et dans une large gamme de température et d' humidité **(Mathew et al., 2011).**

I. 1. 8.2. Levures

a) Flore des champs

Les populations de levures (champignons microscopiques le plus souvent unicellulaires et non pigmentés) dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les genres rencontrés sont : Saccharomyces, Candida, Hansenula, Pichia ne donnent généralement lieu qu' à de faibles niveaux de contamination, ne dépassant que rarement quelques centaines de germes par gramme de grain. Au contraire, des quantités élevées des levures sont souvent le signe d' une humidité élevée à la récolte et /ou d' un pré-stokage humide avant séchage **(Cahagnier, 1996).**

b) Flore de stockage

Selon **(Petersson et Schnürer (1995)) ; (Druvefors et Schnürer (2004)),** La levure *Pichia anomala* est fréquemment trouvée pendant le stockage étanche à l' air du blé. Cette levure est un moyen de lutte contre certains champignons d' altération

du blé stocké tels que *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus candidus*. En outre, le degré d' inhibition des champignons d' altération est lié à la concentration des cellules de cette levure. L' inhibition est plus prononcée à des températures sous l' optimale pour la croissance et la sporulation du *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus candidus*, inférieure à 15° C et supérieure à 30° C. La levure *Pichia anomala* peut pousser entre 3° C et 37° C, à des pH entre 2 et 12,4 et à une activité de l' eau de 0,92.

I. 1. 8. 3. Bactéries : elles proviennent essentiellement du sol, peuvent être identifiées suivant les critères actuels de la classification **(Richard-Molard, 1998)**. Elles se rangent principalement dans les familles suivantes : Pseudomonadaceae (Pseudomonas),Xanthomonadaceae(Xanthomonas),Enterobacteriaceae,Lactobacillaceae, Bacillaceae, etc. Les grains ne constituent pas un milieu favorable pour les germes pathogènes ou toxinogènes comme Salmonella, Clostridium ou Staphylococcus. À la récolte, les produits céréaliers sont toujours faiblement contaminés par les Streptomycetaceae, microorganismes que l' on connait surtout pour leur aptitude à produire des antibiotiques, et dont les principaux représentants sur grains semblent être : (*Streptomyces albus*) et (*Streptomyces griseus*) **(Cahagnier, 1996).**

I.2.La noix de muscade (*Myristica fragans)*

I.2.1. Définition

Un arbre peut porter jusqu'à 2000 fruits. Il y a trois récoles par année. Les fruits sont cueillis et ensuite la chair extérieure de couleur orange est enlevée. Ainsi, l'enveloppe de la graine est libérée. On appelle cette enveloppe macis. Dessous se cache la noix de muscade, puis celle-ci est séchée au soleil tropical pendant en-viron deux mois. La noix de muscade et le macis sont ensuite commercialisés. Il est recommandé d'acheter la noix entière, cela permet de mieux conserver l'arôme. Le macis est également utilisé comme épice. L'arôme du macis est plus fin que celui de la noix.

Figure 02 : Grains de *Myristica fragrans*

I.2.2. Classification de Noix de muscade

Règne : plantae

Classe : dicotylédones

Ordre : Magnoliales

Famille : Myristicaceae

Genre : *Myristica*

Espèce : *Myristica fragans* **(Paloma, 2012).**

I.2.3. L'Utilisation de noix de muscade

L'utilisation de la noix de muscade et du macis est très polyvalente en cuisine.

• **Viande :** les deux épices sont très souvent présentes dans les mélanges d'épice pour toutes sortes de saucisses. Mais, noix de muscade et macis peuvent également être utilisés pour assaisonner des préparations à base de viande hachée, le gibier et la viande de veau.

• **Légumes :** des légumes d'hiver typiques comme les choux (chou frisé, chou blanc, chou rouge, chou coeur de boeuf ou choux de Bruxelles), poireaux, carottes, courges, pommes-de-terre, céleri, salsifis, panais), ainsi que les mets préparés avec ces légumes comme p. ex. gratins, tartes, soupes etc. peuvent être assaisonnés avec un peu de noix de muscade. Cela est aussi valable pour d'autres légumes comme épinards, choux fleurs, brocolis et fenouil.

• **Fromage,** riz, nouilles et sauces : la noix de muscade peut aussi être utilisée pour assaisonner riz, pâtes, mets au fromage et les sauces.

• **Mets sucrés :** Les mets suivants peuvent être affinés avec un peu de muscade : tourtes aux pommes, tartes aux fruits, crêpes, boules de Berlin, pain d'épice, glaces, crème chantilly, sauce à la vanille et riz sucré.

• **Boissons :** Une note particulière peut être ajoutée au : vin chaud, punch, jus de tomate, jus de légumes et chocolat chaud.

I.2.4. Valeurs nutritionnelles

Pour 100g de noix de muscade :

Tableau 02 : Valeurs nutritionnelles

Eau	**6.22g**
Glucides	28.5 g
Lipides	36.3 g
Protéines	5.3 g
Calcium	184 mg
Cuivre	1.03 mg
Fer	3.04 mg
Magnésium	183 mg
Zinc	2.15 mg
Vitamine B9	76 µg
Energie	507 kcal
Energie	2100 Kj

I.2.5. Stockage

Les noix et le macis devraient toujours restés séparés des autres épices, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

Le macis peut être utilisé partout où on peut aussi utiliser la noix de muscade râpée. De plus, le macis se marie particulièrement bien avec les mets au chocolat, au séré sucré et avec les fruits de noyau.

I.2.6. Santé

On utilise la noix de muscade aussi en médecine. L'huile de la noix de muscade se trouve dans des pommades contre les refroidissements, pommades en cas de rhumatisme, pastilles contre la toux, huiles de massage et gouttes pour stimuler la digestion. Les médicaments les plus connus sont : Vicks, VapoRub, Carmol et Klosterrau Melissengeist**. (Kräuter et al, 1988)**

Chapitre II :
Matériel et méthodes

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 **Noix de muscade** *« Myristica fragans»* sur quelques souches des moisissures contaminants le blé dur stocké.

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Noix de muscade *« Myristica fragrans »*

Le matériel végétal qui est la **Noix de muscade** a été acheté au Herboriste de centre ville de Ouargla en Mars 2018.

Figure 03 : Grains de *Myristica fragrans*

II. 2. Matériel fongique

Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité biologique des extraits chaud et froid des noix de muscade 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 : « Czapek yeast Agar (CYA), Glycérol nitrate agar (G25N), Malt extract agar (MEA), Czaperk concentré (CZ), Yeast extract sucrose (YES), Czapek sucrose agar (CDA) »). Il s'agit d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus terreus.*

II. 3. Préparation des extraits aqueux

II.3.1. Séchage du Noix de muscade

Les Noix de muscade ont été séchées à l'air libre, à l'abri de la chaleur et de la lumière pendant trois semaines, on ne les expose jamais au soleil, pour éviter l'oxydation du Noix de muscade. Cette étape a été réalisé pour facilite le broyage.

II.3.2. Broyage

Le broyage a été réalisé par mortier jusqu'à l'obtention de poudre homogène de noix de muscade, puis conservées dans des flacons bien fermée jusqu'à l'utilisation.

II.3 .3. Préparation de l'extrait aqueux froid

La Préparation de l'extrait aqueux froid se fait par la macération de10 g de broyat des noix de muscade pendant 24 heures sous agitation continue à 200 rpm/min à température de 25°C dans un Erlenmeyer, à laquelle nous avons ajouté 100 ml d'eau distillé **(Razak et *al*., 2009).** Le mélange préparer 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. A la fin de l'extraction, les fractions obtenues sont récupérées dans un flacon stérile et conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'au moment de leurs utilisations **(Sheng-Hsien et al., 2007).**

.II.3.4. Préparation de l'extrait aqueux chaud

Pour cette extraction on prend 10 g de broyat des noix de muscade et mettre dans un Erlenmeyer, après on ajoute 100 ml d'eau distillé bouillante à 100 °C. Après 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 **(Bassimane et Maamri, 2017).**

L'extrait obtenu est conservé dans un flacon stérile à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'au leurs utilisations **(Sheng-Hsien et al., 2007).**

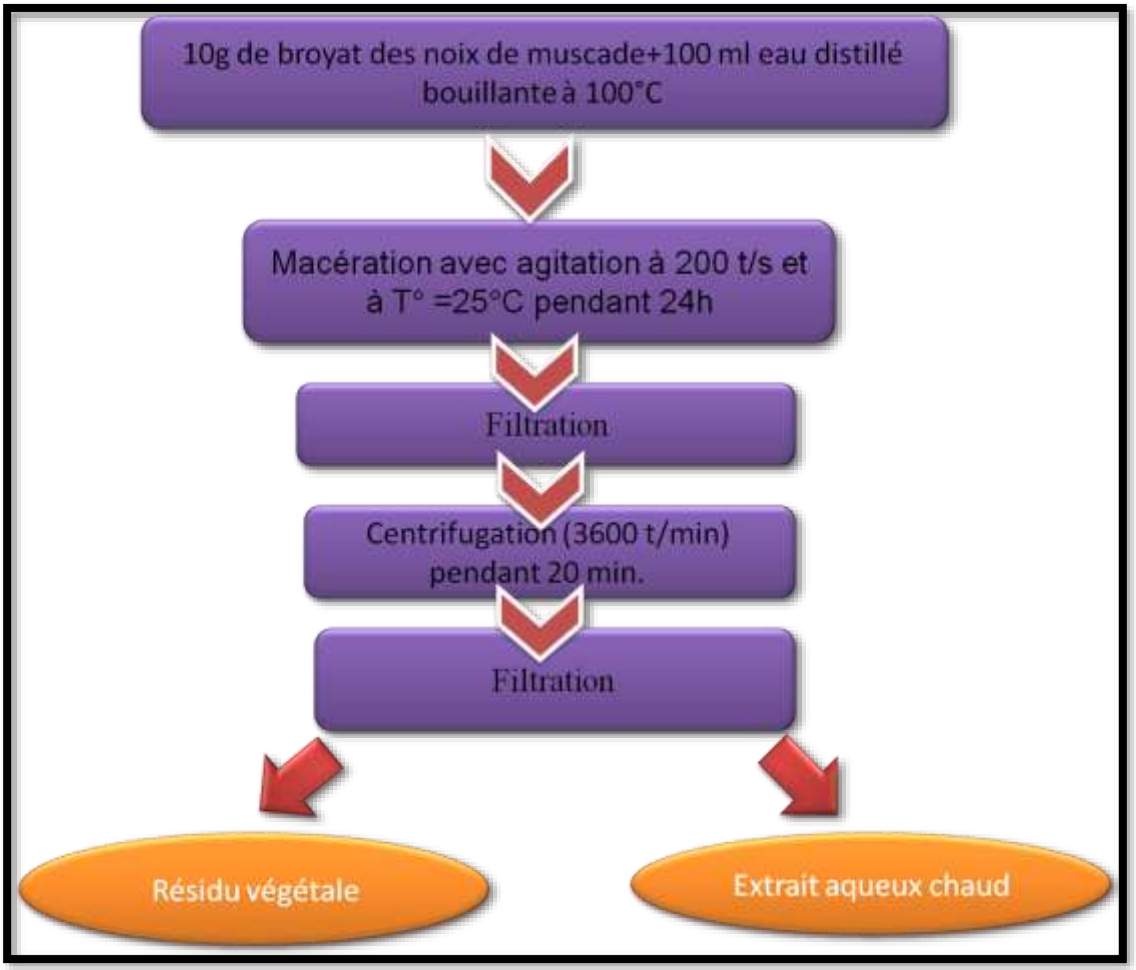


Figure 04 : Etapes de la préparation d'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans*.

II.3.5. Analyses physiques des extraits 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. **(Multon, 1982)**.

b. Indice de réfraction

L'indice de réfraction des extraits aqueux chaud et froid des noix de muscade est obtenu par le calcul 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. **(Multon, 1982)**.

III.3.6. Détermination du rendement des extraits secs

Le rendement est la quantité d'extrait centrifugé 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 multipliée par 100. Ceci se traduit par la formule suivante (**Djeneb et *al* ., 2016*)*.**

$$Rd = (mx100) /M$$

m : masse en gramme de l'extrait sec

M : masse en gramme de la matière végétale sèche

Rd : rendement.

II.4. Tests phytochimiques

Cette 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).** Pour ce faire, les différents extraits obtenus ont été soumis aux tests phytochimiques. Ces derniers sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de colorations et de précipitationsainsi que des examens en lumière ultraviolette. Les différentes familles de composés chimiques recherchées dans cette étude sont les suivantes :

II.4.1. Détection des polyphénols

a_1- Détection des tanins

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait stérile (après la microfiltration) placé dans un tube en présence de quelques gouttes de $FeCl_3$ (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques **(Karumi et *al*., 2004).**

a_2- Détection des coumarines

Les coumarines sont révélées à partir de 5 ml d'extrait stérile 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 agitation, le volume total est devisé en deux volume, l'un sert

de témoin et l'autre est ajouté à 0.5ml de NH_4OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (**Bruneton, 1999)**

a3- Détection des anthocyanes

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait stérile dans un tube auquel en ajoute 15 ml d'H_2SO_4 à (10%) (milieu acide), après agitation, le mélange est ajouté à 5 ml NH_4OH à (10%) (milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique **(Bruneton, 1999)**.

a4- Détection des flavonoïdes

Un mélange de quelques gouttes de mg^{2+} et de gouttes d'HCL concentré, placé dans un tube, est ajouté à 2ml d'extrait stérile. L'apparition de la coloration rose, orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes **(Malec et Pamelio, 2003)**.

a5- Détection des anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait stérile sont ajoutés à 5 ml de NH_4OH à (10%). Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinone **(Oloyede, 2005)**.

a6- Détection des saponosides

Pour la détection des saponosides, 10 ml d'extrait stérile 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).**

b- Détection des stéroïdes

Les stéroïdes sont révélés après addition de 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml d'extrait stérile 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).**

c- Détection des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10 ml d'extrait stérile 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 ajouté. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes **(Mojab et *al.*, 2003)**.

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

II.5.1. Activation des souches

. L'activation des souches fongiques se fait par le prélèvement d'un fragment mycélien des souches isolées (Les souches fongiques isolées préalablement ont été conservées pendant une année en milieu solide PDA à 25°c) pour faire un nouvel ensemencement sur le même milieu de culture sans agent sélectif (PDA). Ce fragment mycélien est ensemencé au centre de la boite pour obtenir des souches activées après leurs incubations pendant 7 jours à 25°c.

II.5.2. Préparation des suspensions sporales

La préparation de suspensions sporales, consiste en l'inoculation de quelques spores d'une culture jeune 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).** Cette méthode permet la conservation des isolats et 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* .

Sur milieu gélosé « PDA » qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique (fongistatique ou fongicide) des extraits aqueux de noix de muscade 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.

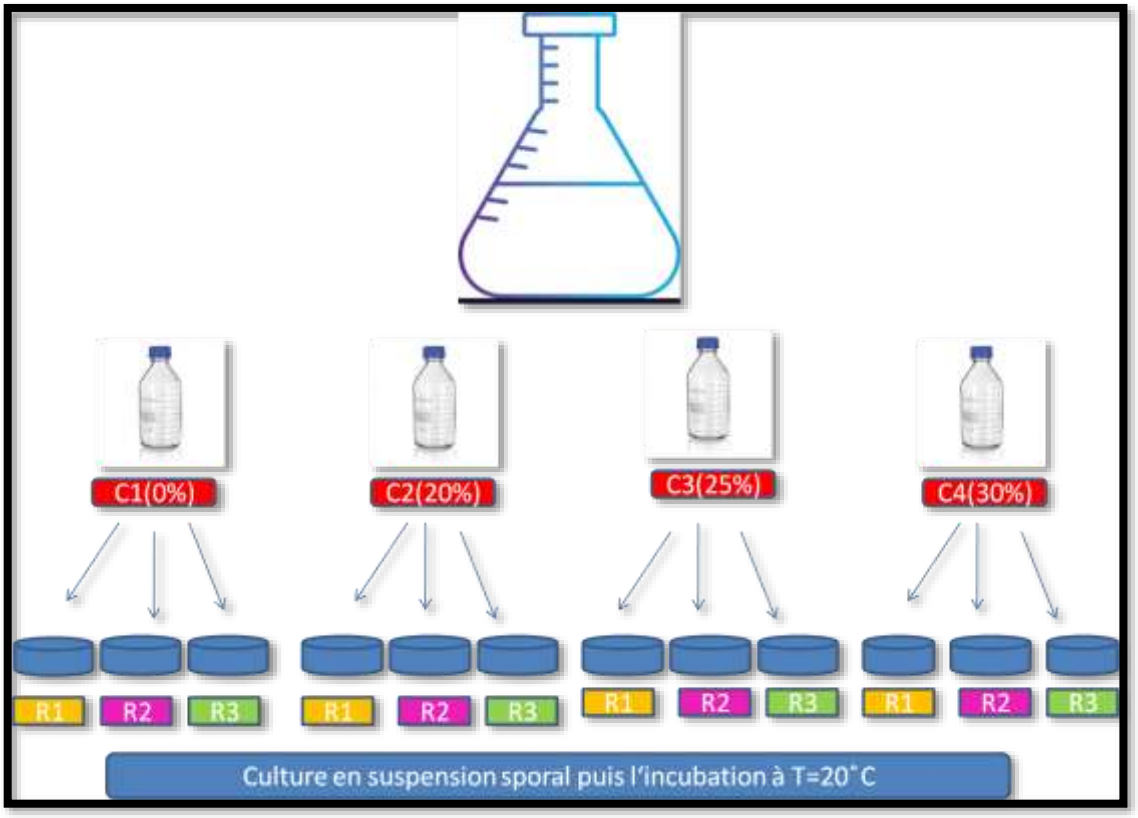


Figure 05 : Préparation des différentes concentrations des extraits aqueux

- Tous les étapes suivantes se fait dans la zone stérile.
- Il faut faire l'agitation des mélanges jusqu'à leur homogénéisation,
- Coulés le mélange dans boites Pétrie de (53 mm).
- Après solidification du milieu (PDA+ Eq), l'inoculation se fait par une suspension sporale,
- À l'aide d'une micropipette stérile en mettant une goutte au centre de boite
- (Faire cette opération pour chaque souche et chaque concentration d'extrait aqueux) (figure04).
- Les boites de pétri fermées par le parafilm et incubées à l'obscurité à une température de 25 ± 2°C.
- Chaque concentration d'extraits aqueux chaud et froid est répétée trois fois.

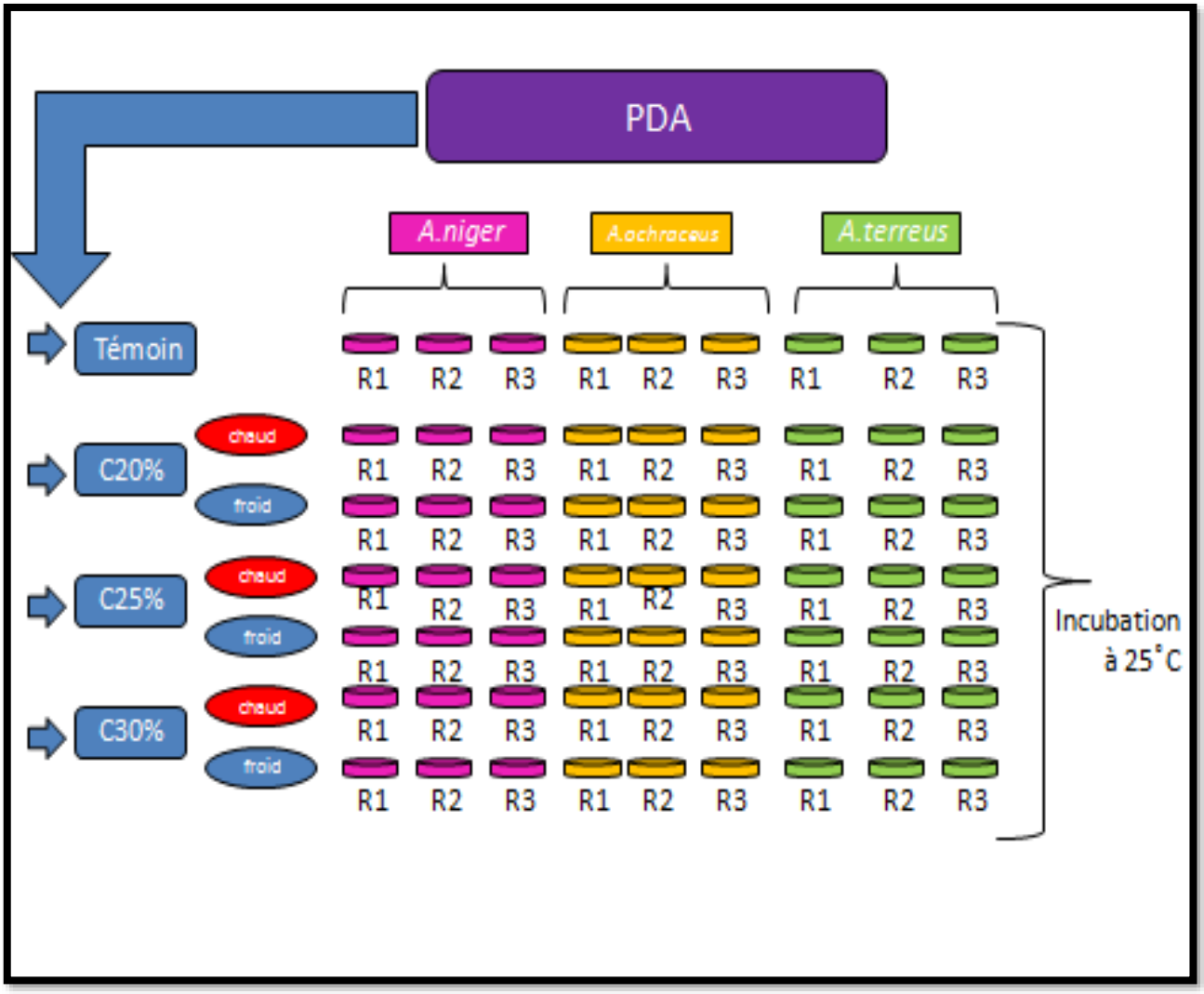


Figure 06 : Protocole expérimentale des différentes concentrations des extraits aqueux de *Myristica fragrans* ***(A.niger ; A.ochraceus ; A.terreus)***

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 pour inhibées le métabolisme des bactéries.

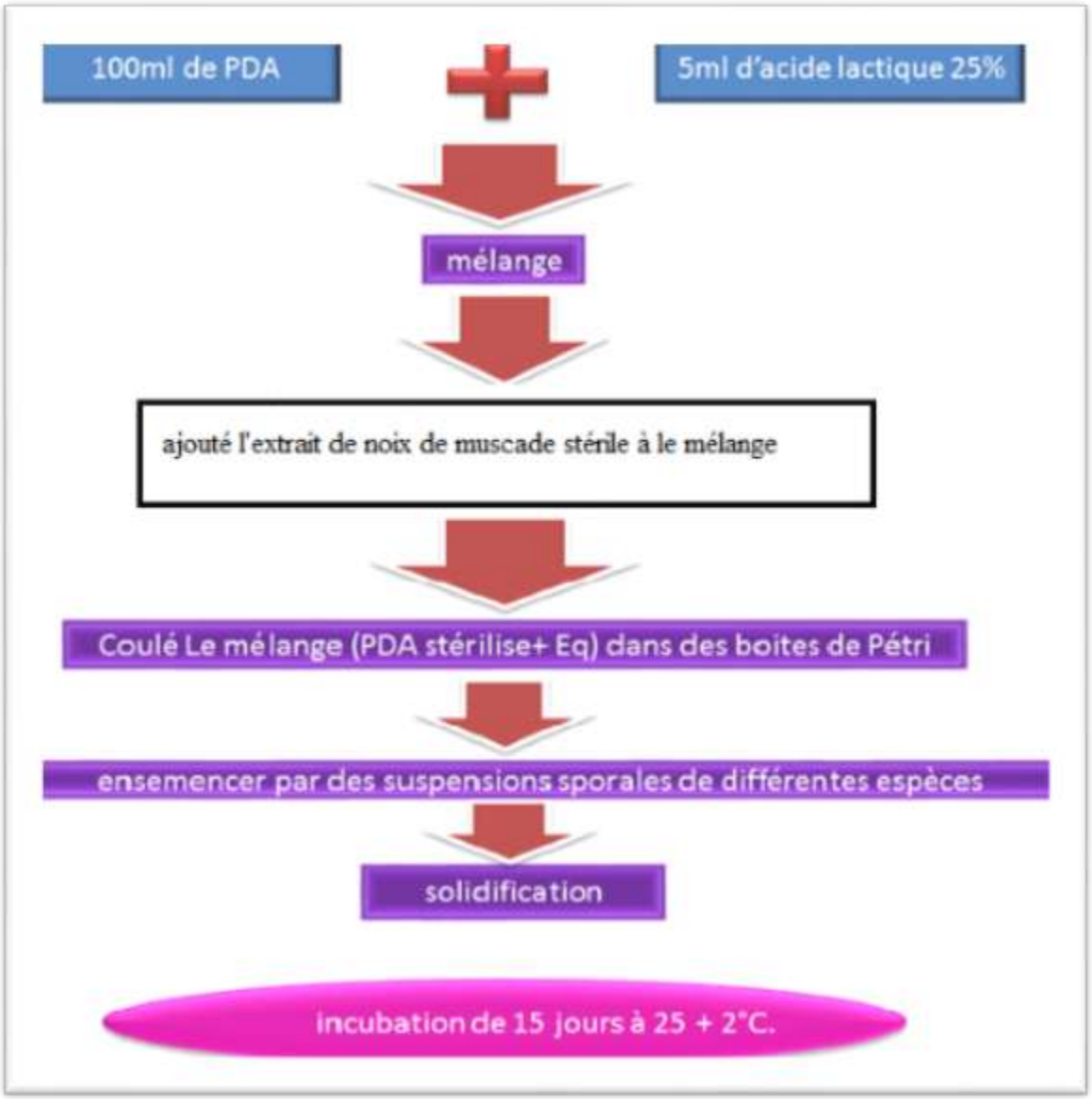


Figure 07 : les étapes expérimentales de la méthode de contact direct de *Myristica fragrans*

II.6. Paramètres étudiés

L'Expression des résultats des tests antifongiques des extraits aqueux chaud et froid de noix de muscade sur les souches fongiques choisis dépond des 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 168 h (7 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)**

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

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

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

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

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

e. Taux d'inhibition (TI%)

Les taux d'inhibition de la croissance par rapport au témoin, sont ensuite calculés selon 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 boite de Pétri puis à l'aide des embouts stérile. On va transférer le disque dans un tube 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 de noix de muscade 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 *noix de muscade,* 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 µl de suspension sporale avec 300 µl 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 µl d'eau distillée stérile et 300 µl de suspension sporale, l'incubation est pendant 24h dans 25°C.

L'étape suivant consiste à étale 50 µl de chaque tube Eppendorf sur des lames recouvrées 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 donnés 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 03: Les caractères physiques des extraits aqueux froid et chaud de *noix de muscade*

Param / Eq	pH	Indice de réfraction	Rendement en (%)
Extraits aqueux froid	4.5	1.470	27.32
Extraits aqueux chaud	4.7	1.470	34.2

A partir de tableau ci-dessus on remarque que le pH est acide et ils y ont aucune déférence dans toutes les paramètres dans les deux extraits aqueux sauf que au rendement qui on obtient la valeur élevé dans Extraits aqueux chaud de 34.2% par rapport à l'extrait aqueux froid qui est de 27.32%.

III.1.2. Tests phytochimiques

Tableau 04 : Teste phytochimiques des extraits aqueux froid et chaud de *noix de muscade*

		Extraits aqueux de *noix de muscade*	
Groupe chimique		Chaud	Froid
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 *noix de muscade* possèdent la même composition chimique. La caractérisation chimique de ces deux extraits aqueux froid et chaud a démontré la présence des Polyphénoles sous forme des Tannins, Flavonoïdes, Terpènes et Saponosides avec l'absence d'Anthocyane, Anthraquinone et Coumarine.

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

III.2. Activité Antifongique

III.2.1. Activité antifongique des extraits aqueux.

III.2.1.1. Extrait aqueux froid

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

Tableau05 : Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur les souches testées

Le tableau ci-dessus représente l'effet de l'extrait aqueux froid sur la morphologie des souches testé au cours de temps d'incubation (7j), d'après les résultats

Concentration / Espèce	0%	20%	25%	30%
A.niger				
A.terreus				
A.ochraceus				

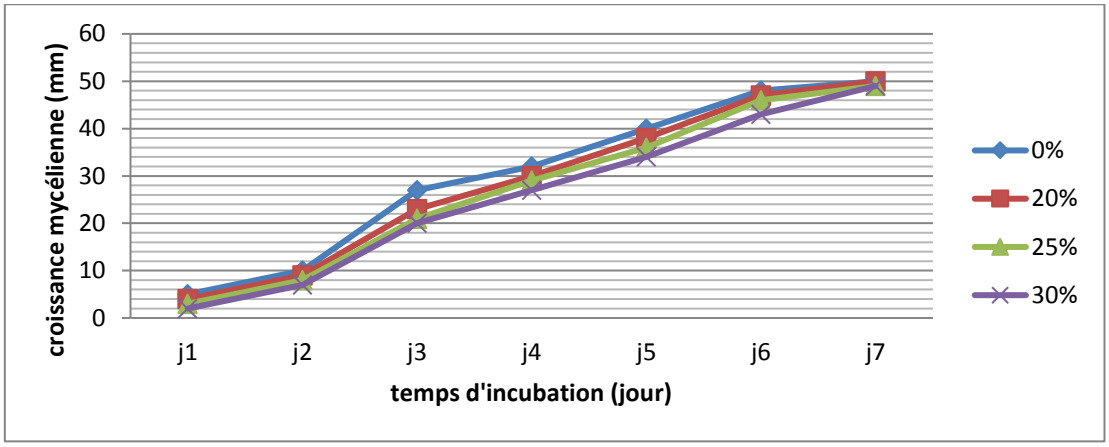
obtenus on remarque que la réponse des souches sur l'extrait aqueux froid est différente d'une espèce à l'autre.

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

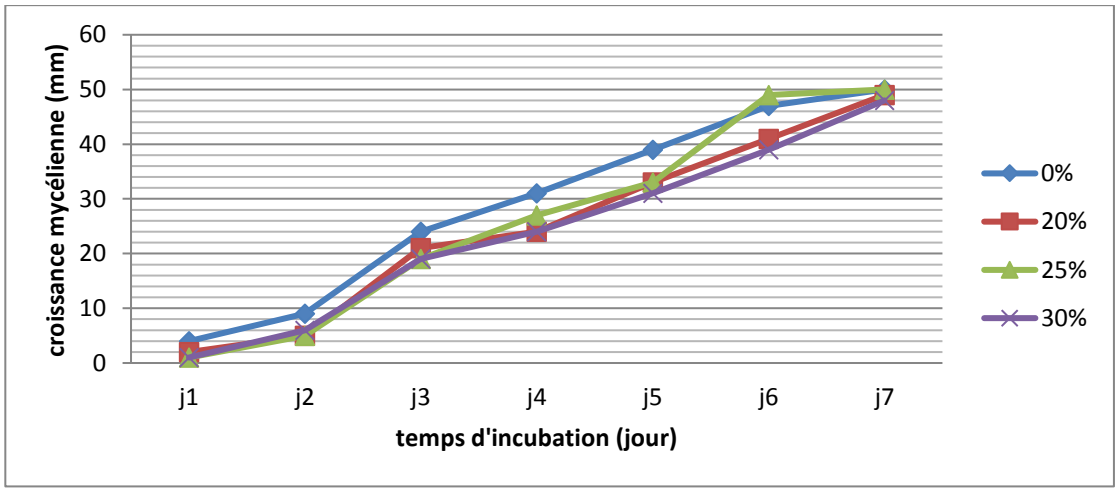
b. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux froid sur la cinétique de croissance mycélienne

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

A.niger



A.terreus



A.ochraceus

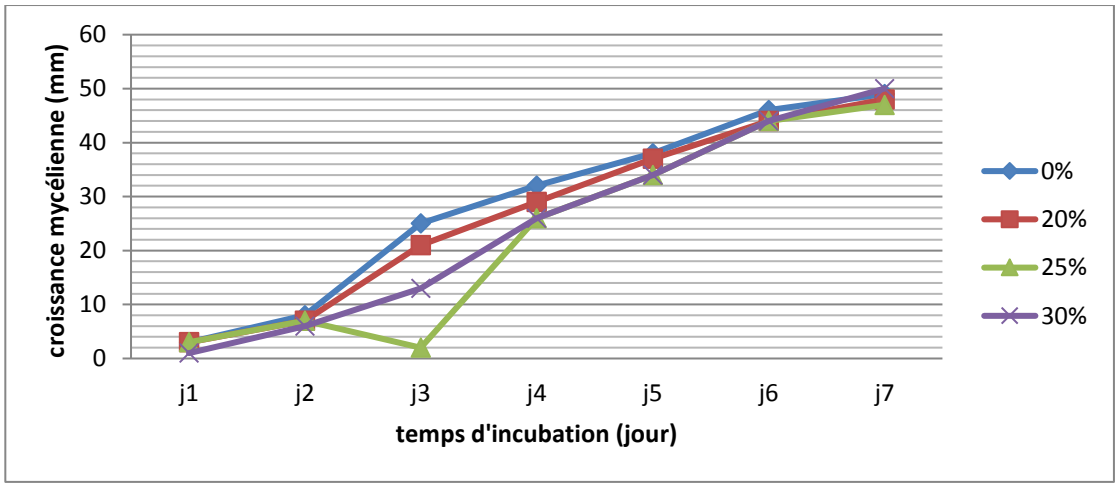


Figure 08 : Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction du temps et concentration d'extrait aqueux

D'après les 3 graphes précédents on remarque que la croissance mycélienne de toutes les souches fongiques aux concentrations 0%, 20%, 25% et 30% a commencé après 24 h d'incubation.

Les résultats sont variés selon les souche testé et les concentration utilisée 0%, 20%, 25% et 30%, les résultats se manifeste par la différents en diamètres de la zone de croissance mycélienne de toutes les souches fongiques au coure du temps d'incubation., et dépendent de la croissance mycélienne de témoin qui est importante

Pour la concentration 30%, *A .niger* manifesté une rapide croissance qui atteindre 50 mm, suive par *A.ochraceus* d'une croissance de 49 mm , suive par *A .terrus* d'une croissance de 48 mm après 7jour. (Figure 8).

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 boites Pétries contenants le milieu PDA.

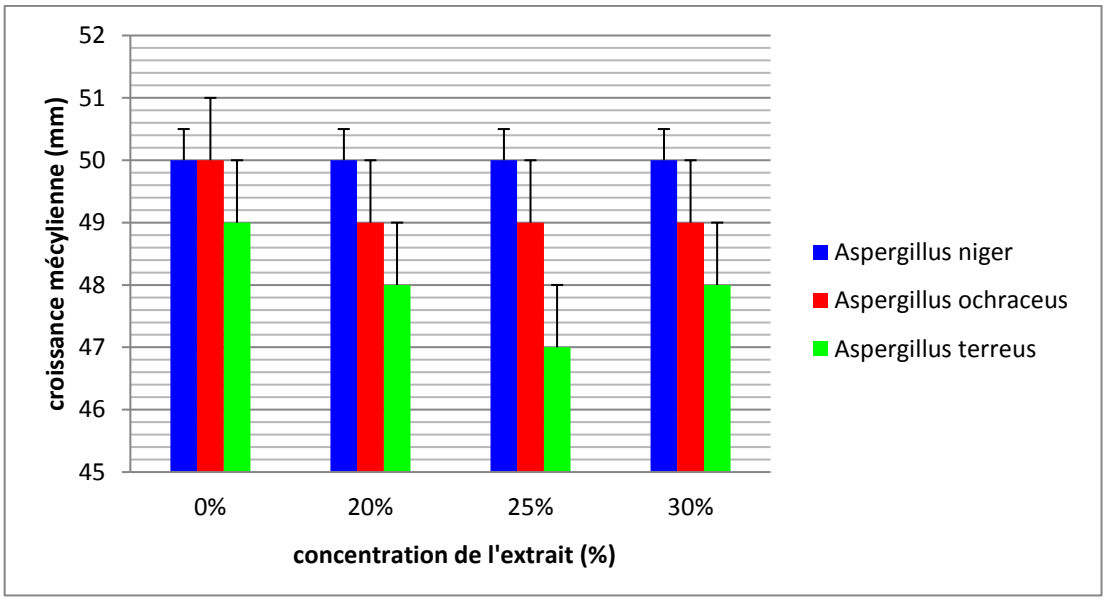


Figure 09 : Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extrait aqueux froid de *Myristica fragrans.*

On observe que le diamètre mycélien final est différé pour chaque espèce. L'*Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus terreurs* possède une variation de croissance mycélienne en fonction de concentration d'extrait, cette croissance diminue en augmentant la concentration jusqu'elle atteindre 49mm et 47mm respectivement à concentration 30%.et l'augmentation de L'*Aspergillus ochraceus* plus que l'*Aspergillus terreurs*

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 10 :

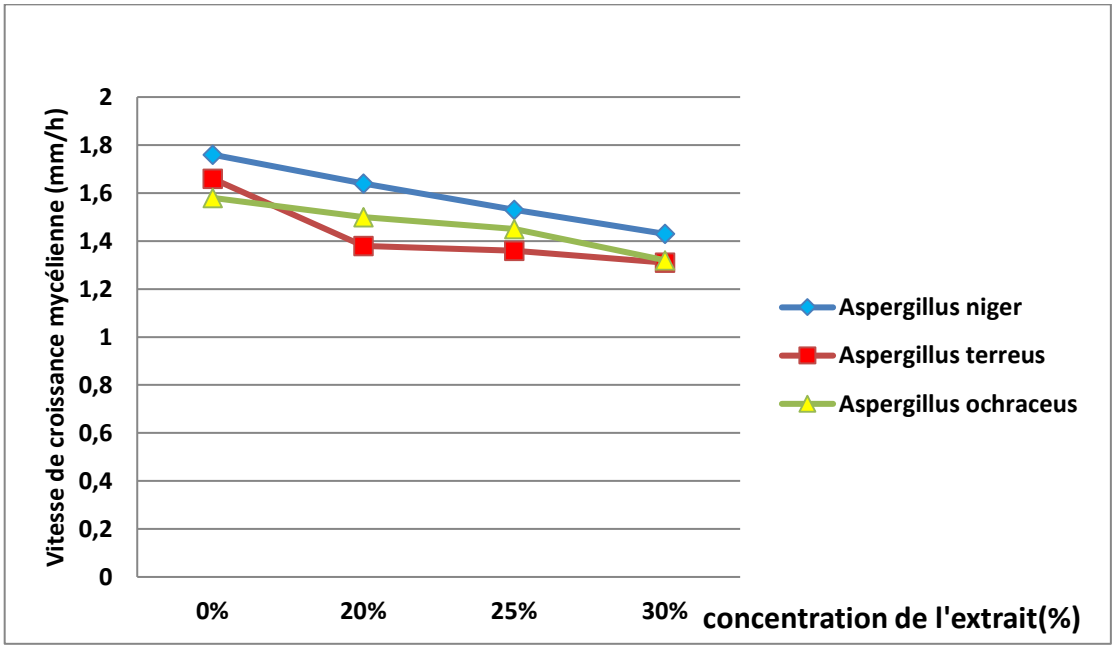


Figure10 : Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux froid de *Myristica fragrans.*

La figure 10, présente la vitesse de la croissance mycélienne des trois souches fongiques en fonction de la concentration d'Eq froid. On observe dans la figure que la vitesse de croissance mycélienne est diffère d'une espèce a une autre, la plus haute est presque dans tous les cas est marqué du témoin pour toutes les souches dans la

concentration 0%. Avec une vitesse de 1 .76 mm/h, puis cette vitesse a diminué jusqu'à 1 .43 mm/h dans la concentration de 30% d'Eq pour *A.niger* et à 1.66mm/h, 1.31mm/h pour *A.terreus* et *1.58mm/h ,1.32mm/h pour A.ochraceus.*

A partir de ses résultats on remarque 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 11.

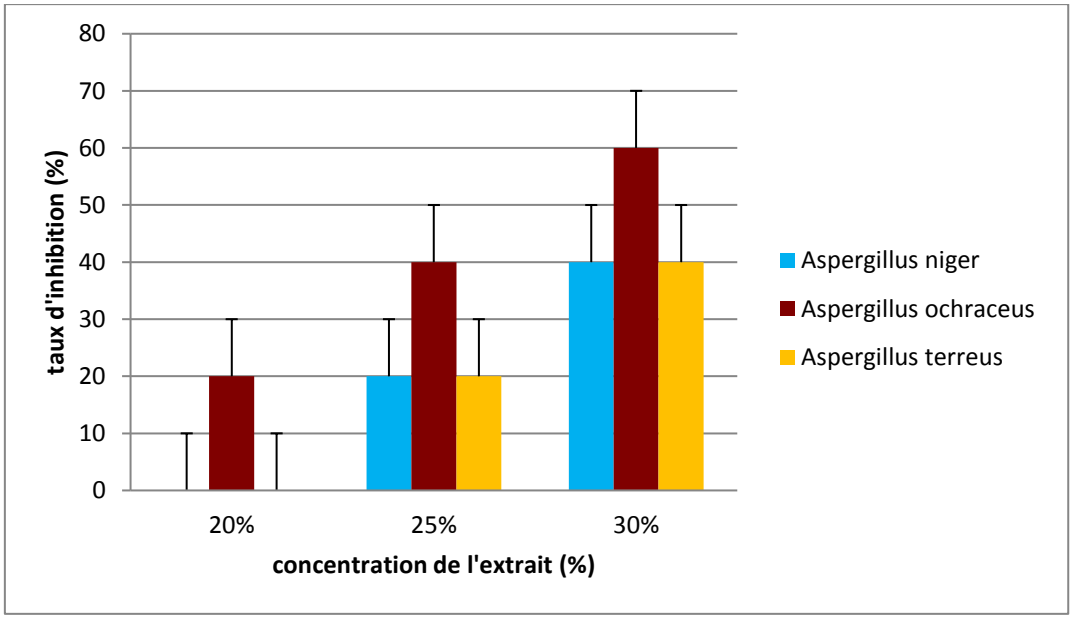


Figure 11 : Taux d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait aqueux froid de *Myristica fragrans.*

La figure 11 montre les résultats d'inhibition du diamètre mycélienne sous l'effet de l'extrait aqueux froid de *noix de muscade* au cours du temps d'incubation (7jours).

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 l'espèces *Aspergillus ochraceus* dans les différentes concentrations 20%

25% 30%. Sauf pour *l'Aspergillus niger et Aspergillus terreus* qui n'a représenté aucune inhibition dans la concentrations 20% et posséd une inhibition pour la concentrations 25% 30%.

f. *Production* de spores (T S)

La figure 12 représente le taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.

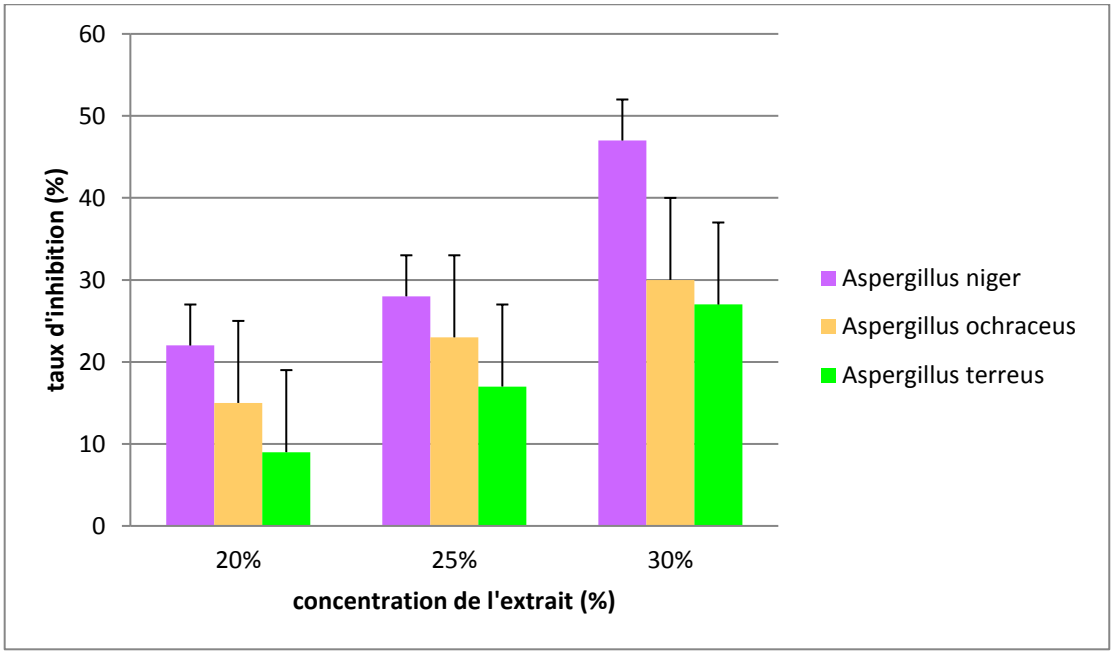


Figure12 : Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.

On observe que le taux d'inhibition de production des spores augmente à mesure que la concentration d'extrait aqueux froid augmente. On remarque que la plus forte inhibition de la sporulation dans la concentration 30%est de 45.60% chez *A. Niger*, et la plus faible inhibition en 20% est de 9.31% chez *A. terreus*

L'A. Niger c'est la souche de plus forte inhibition de la sporulation pour les 3 concentrations (20% .25% .30%), et l'*A. terreus* la plus faible inhibition de la sporulation pour les 3 concentrations (20% .25% .30%), en autre coté *A ochraceus c'est la souche de* moyenne inhibition

Chez *A. niger* dans la concentration 20% TS est 22 .20%, et 25% est 28.31%, *A ochraceus* en 20% est 15 .57%, dans le 25% ,30% est 23.13%,30.86% respectivement, *A terreus* en 25% ,30% est 17.01% ,27.23% respectivement.

g. Germination de spores (TG)

La figure13, représente l'inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différentes concentrations.

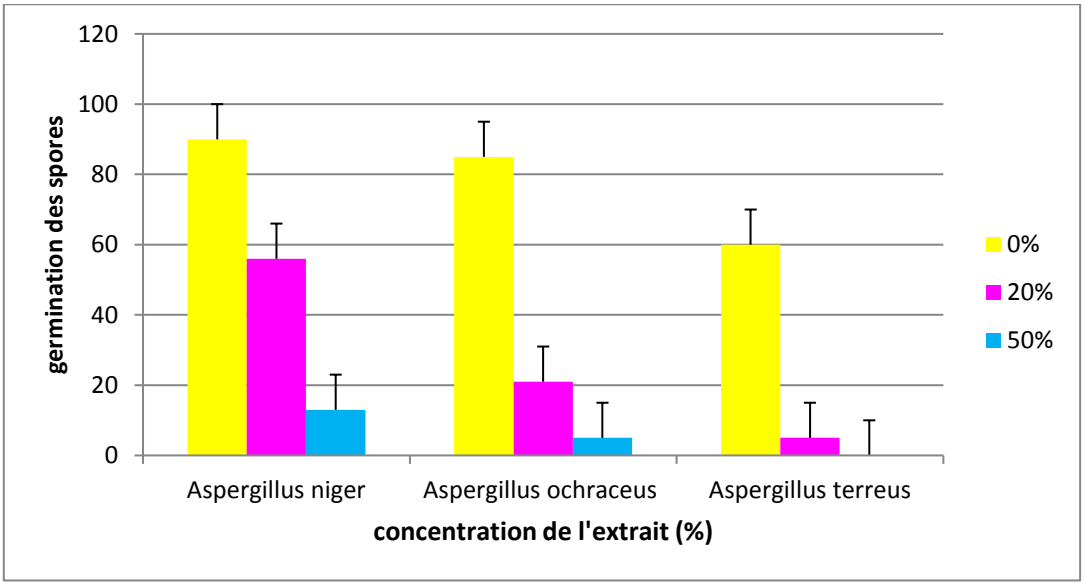


Figure13 : Inhibition de germination de spore sous l'effet de l'extrait aqueux froid en fonction de différente concentration.

On observe dans le témoin qu'après 24h la germination des spore presque total et maximal pour *A.niger, A.ochraceus* , avec une valeur de 90% .85% mais n'est pas total pour *A.terreus* 60%.

Après la comparaison de taux de germination de spore dans le témoin et en présence d'extrait on trouve une inhibition presque juste dans la concentration 20% avec les 3 souches *A.niger A.ochraceus* de moyenne inhibition de germination , et avec une très faible inhibition de germination chez *A.terreus* mais pour la concentration 50% d'extrait aqueux l'inhibition de la germination est tres faible et inferieur a 10% pour *A.niger, A.ochraceus* et aucun pour *A.terreus*

III.2.1.2. Extrait aqueux chaud

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

Tableau 06 : Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur les souches testées

Concentration / Espèce	0%	20%	25%	30%
A.niger				
A.terreus				
A.ochraceus				

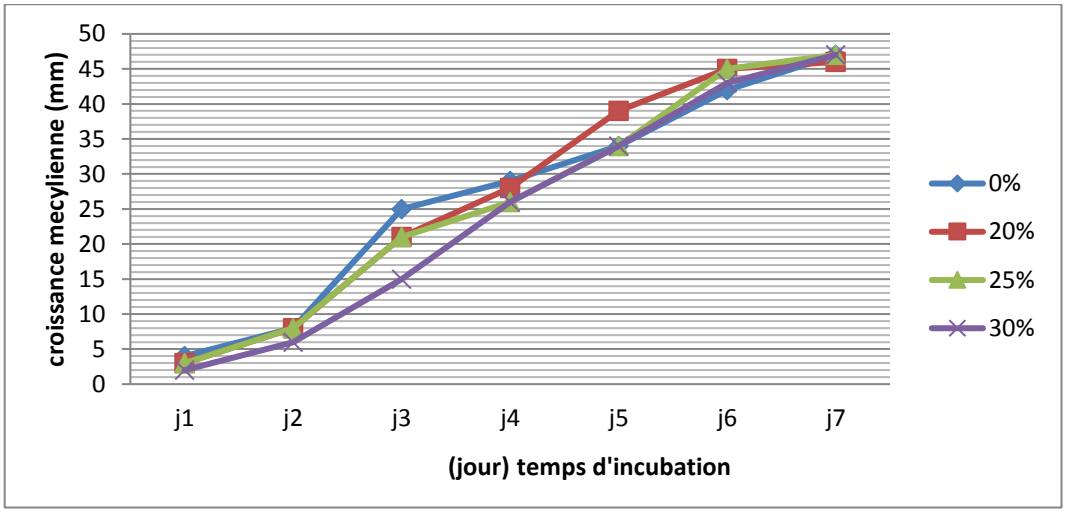
Le tableau ci-dessus représente l'effet de l'extrait aqueux chaud de noix de muscade sur la morphologie des souches testé au cours de temps d'incubation (7j), d'après les résultats obtenus on remarque que l 'activité antifongique s'accroit en augmentant la concentration de l'extrait aqueux chaud.

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

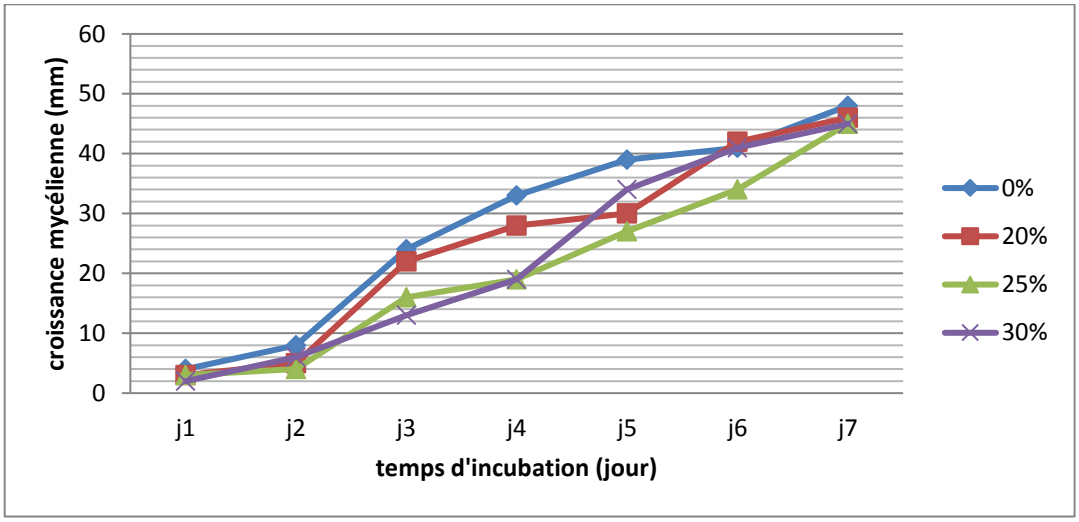
b. Effet de différentes concentrations d'extrait aqueux chaud sur la cinétique de croissance mycélienne

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

A.niger



A.ochraceus



A.terreus

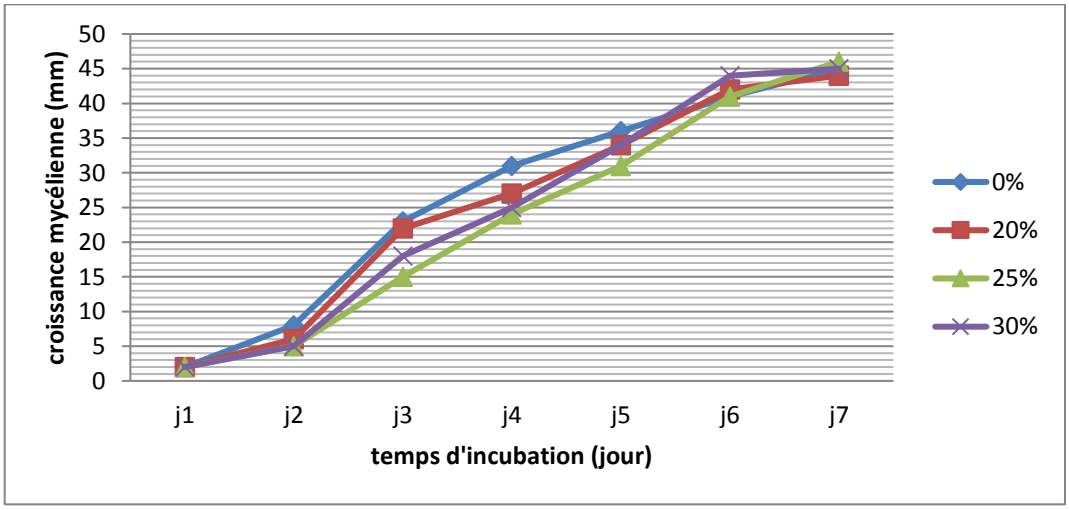


Figure 14 : Cinétique de croissance des souches fongiques en fonction de temps et concentration d'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans.*

D'après le graphe on observe 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 ochraceus* aux concentrations 20%, 25% et 30% la cinétique de croissance est presque semblable durant tous les jours. Elle est de 2mm à 48mm chez *Aspergillus niger*, et de 1mm à 45mm chez *Aspergillus ochraceus*. Alors que L'*Aspergillus terreus* dans ces toutes concentrations le diamètre de la croissance mycélienne est moins que les deux autres souches, elle est de 1mm et 44mm.

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

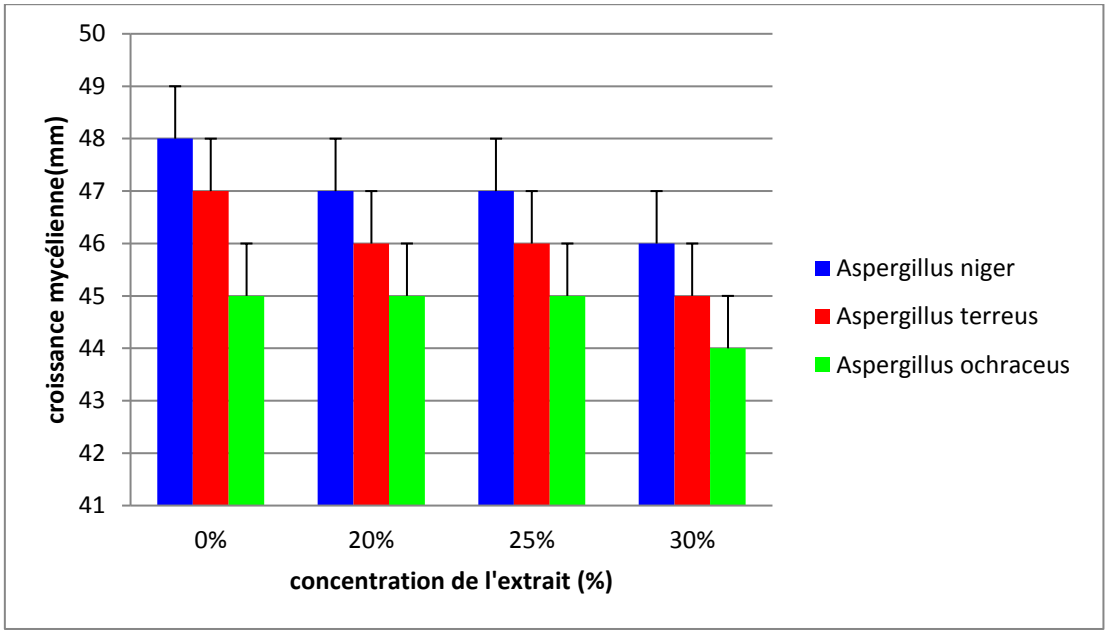


Figure15 : Variation de la croissance mycélienne finale sous l'effet d'extraits aqueux chaud de *Myristica fragrans.*

La figure (15) 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 boite de pétri en comparaison avec les différentes concentrations sous l'effet de l'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans***.**

On observe que la croissance mycélienne pour les trois souches fongiques *A.niger* et *terreus A.ochraceus*, diminue lorsque la concentration d'Eq chaud de noix de muscade augmente. Le plus grand diamètre de croissance mycélienne a été constaté pour l'*A.niger* et *terreus* chez le témoin (0%) qui est de 48 .47 mm. L'*A.niger* possède une variation de croissance la plus remarquable en fonction des concentrations d'extrait, cette croissance diminue en augmentant la concentration jusqu'elle atteindre 46 mm a concentration 30%. Chez A. *terreus* dans la même concentration (30%), possèdent un diamètre de croissance plus élevé que *A.ochraceus*, il est de 45mm et 44 mm respectivement.

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 16.

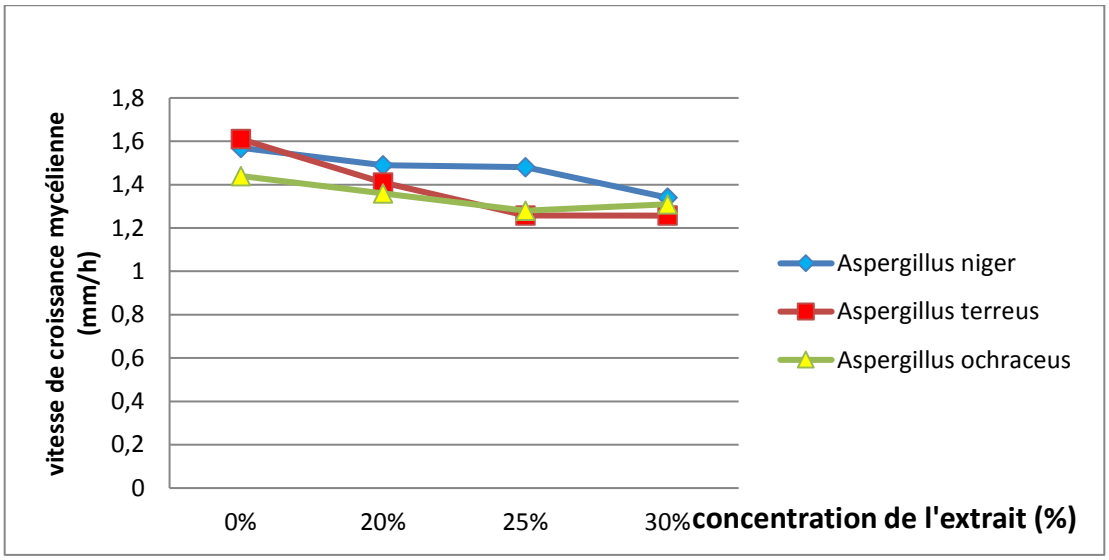


Figure 16 : Vitesse de croissance mycélienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans.*

On observe que la vitesse de la croissance mycélienne décroit par l'augmentation de la concentration d'extrait aqueux chaud de *Myristica fragans.* La plus haute vitesse de croissance mycélienne est registrée à 0% en absence d'extrait aqueux avec une vitesse de 1 .66 mm/h.

La vitesse des souches est diminuée jusqu'à 1.2 mm/h dans la concentration 30% d'extrait aqueux chaud de *Myristica fragrans*.

e. Taux d'inhibition

La figure 17 présente le taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud :

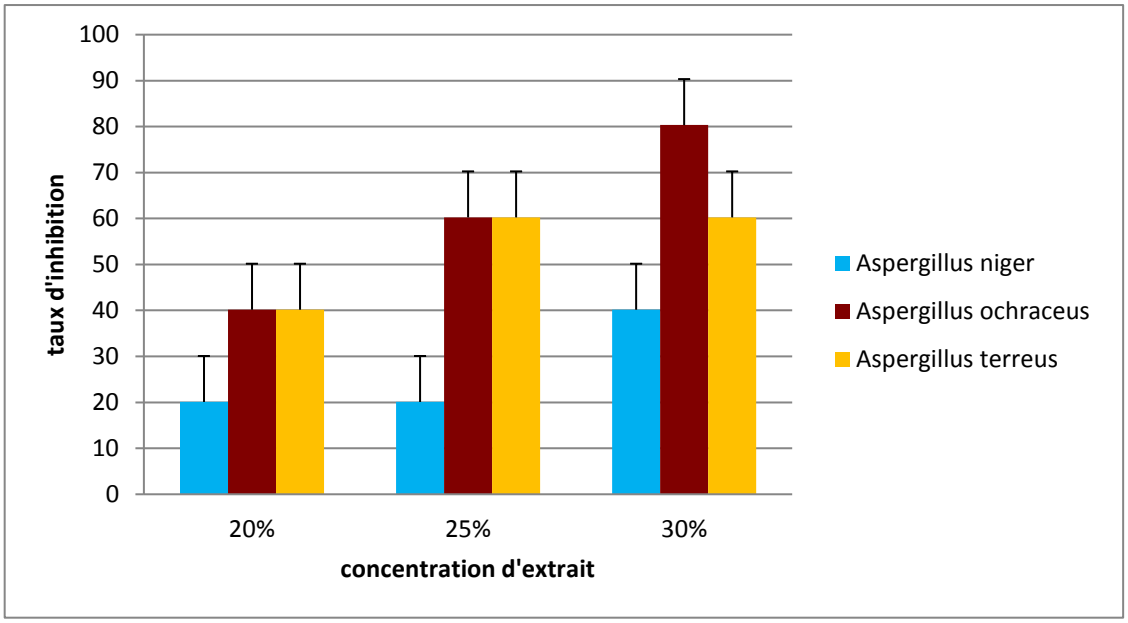


Figure 17 : Taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud

Selon le graphe, le taux d'inhibition variée 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 toutes les souches fongiques, ce TI est de 80,33 % chez *A.ochraceus*, 40.25 % chez *A.niger*, et 60.25% chez *A.terreus*.Le TI est plus faible en utilisant la concentration 20%, il est de 40.16 % chez l'*A. ochraceus*, 20.08 % chez *A.niger*, et 40.16 % chez l'*A.terreus*.

f. Production de spores (T S)

La figure 18 représente le taux d'inhibition de la production de spores sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration**.**

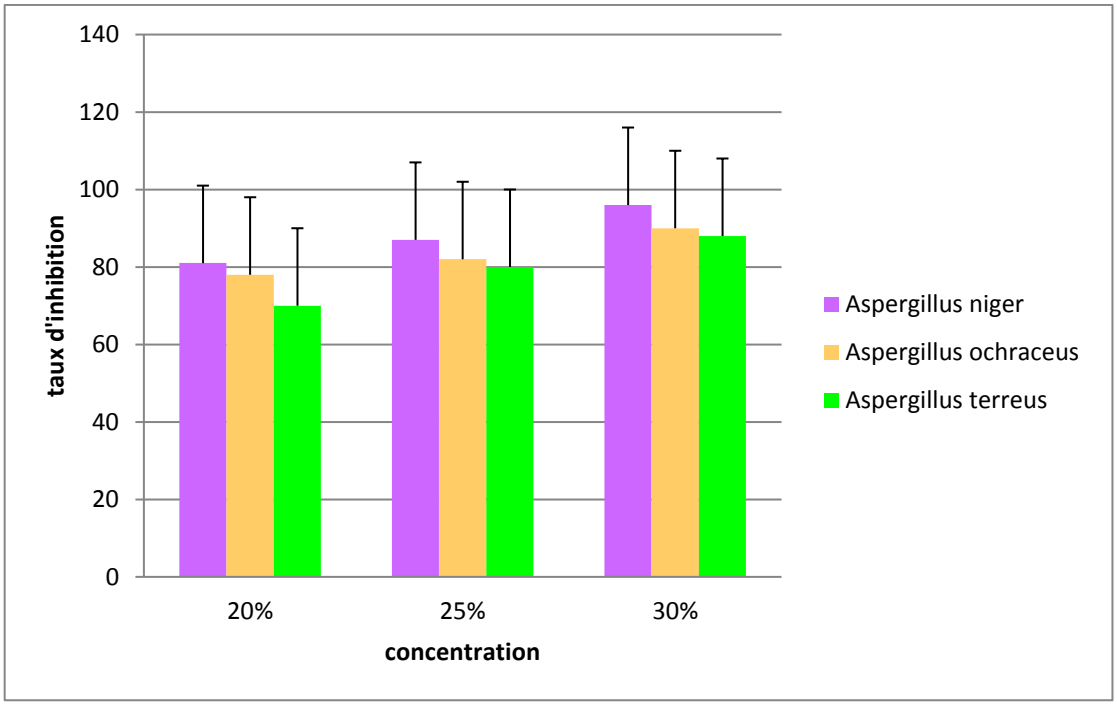


Figure 18 : Taux d'inhibition de la production de spore sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration

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 se variée en augmentant la concentration d'extrait aqueux chaud. Il est de 87%. 96% chez *A niger* dans les concentration 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 19 représente l'inhibition de la germination de spore des souches testées sous l'effet de l'extrait aqueux chaud en fonction de différente concentration.

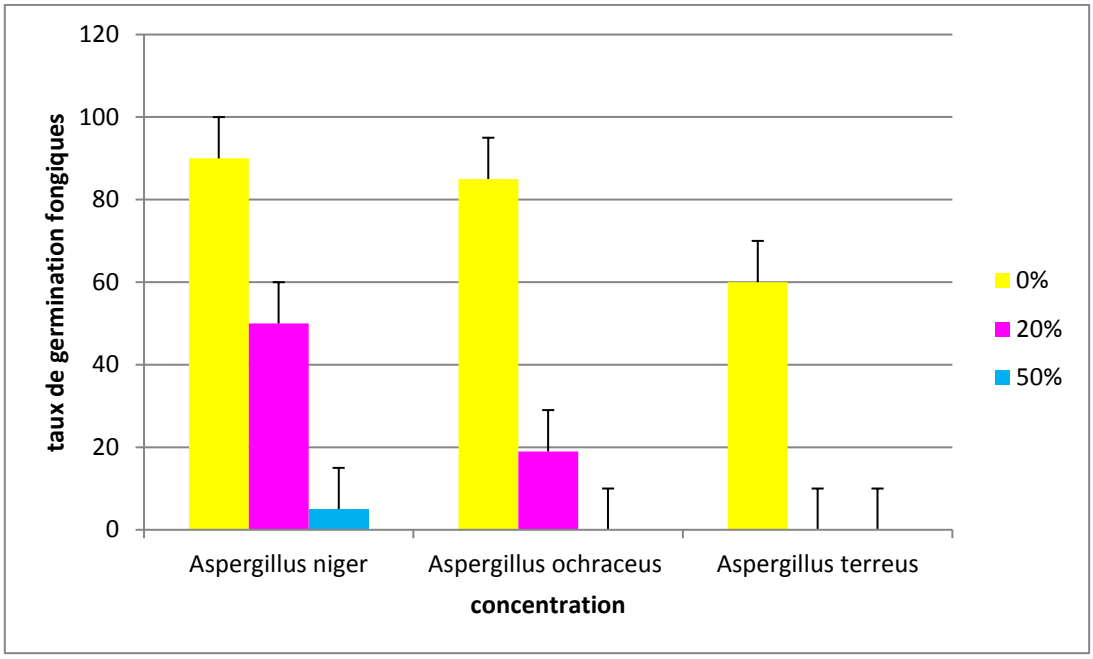


Figure 19 : Taux d'inhibition des souches fongiques en fonction de la concentration d'extrait aqueux chaud

On observe dans le témoin que après 24h le taux de germination des spore est de 96.01%, 85 .21 % et 60.10 % chez *A.niger*, *A.Ochraceus* et *A.terreus* , 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 50.11% et 19.31% chez *A.niger*, *A.Ochraceus* respectivement, alors que chez *A.terreus* on remarque l'absence d'inhibition de germination dans cette concentration. En utilisant la concentration à 50% de cet extrait, on observe presque une absence totale d'inhibition de germination des spores chez les trois souches testées sauf *A.niger* avec une faible concentration .

III.3. Discussion

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

La mesure de pH des extraits aqueux de noix de muscade a donné un pH acide qui sont presque les mêmes 4.5 et 4.7 pour Eq froid et Eq chaud respectivement. **Ahmad *et al*., (2012)** a montré que l'acidité de noix de muscade est due principalement à un composé polyphénols et un composé acide qui est l'acide myristique (acide tétradécanoïque) **(Anakate.2009)**.

Les rendements obtenus des extraits aqueux de noix de muscade *(Myristica fragrans*) sont 27.32% et 34.20 % 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 élevé 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.

L'activité antifongique des différents extraits aqueux de *Myristica fragrans* ont montré une légère inhibition de la croissance de *A.ochraceus* par rapport aux autres souches fongiques. Cette inhibition est de l'ordre de 60% et 80.33 % 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 noix de muscade 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.

Les tests phytochimiques révèlent la présence des métabolites secondaires dans les deux extraits aqueux chaud et froid. Parmi eux ; les tanins et les saponosides. Selon (**Sadipo et *al* (1991),** les tannins sont responsables de la précipitation des protéines indispensables des micro-organismes. Parmi les substances phytochimiques douées d'une activité antifongique, on cite principalement les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polyphénols et les stéroïdes **(Irobi et Daranola, 1994 ; Brantner et *al*., 1996 ; Yan et *al*., 2008)**. Le screening phytochimique des flavonoïdes a révélé la richesse de Myristica fragrans en flavonoïdes. Nos résultats corroborent les résultats de **(Sibi et al., 2013)** ; et **(Devi Tacouri et al., 2013),** qui témoignent la richesse des épices en flavonoïdes. Ils se sont révélés être des substances antimicrobiennes actives in vitro contre un large

spectre de microorganismes. Cette activité serait due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires solubles et à la paroi bactérienne **(Cowan, 1999).**

Les travaux de **Scalbert (1991), Banso et Adeyemo (2007)** et **Bassou , (2007)** ont démontré que les tanins isolés des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons.

Selon **Farag** et ***al* (1989)**, la présence des groupements OH dans les composés phénoliques est capable de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes et d'accroître l'activité antimicrobienne.

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 l' extrait 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

L'objectif de notre étude consiste à étudier l'activité antifongique des extraits aqueux « froid » et « chaud » de noix de muscade ***« Myristica fragrans »*** sur certaines moisissures contaminants le blé dur stocké en vue d'être utilisé comme un bioconservateur. Les rendements obtenus des extraits aqueux de noix de muscade *(Myristica fragrans*) sont 27.32% et 34.20 % pour l'extrait aqueux froid et pour l'extrait aqueux chaud respectivement.

On a évalué l'activité des extraits aqueux de noix de muscade chaud et froid avec différentes concentrations (0, 20, 25 et 30%) sur l'activité de trois champignons qui sont *A.ochraceus, A. Niger* et *A. terreus*. Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux chaud de noix de muscade étudié possède des effets antifongiques élevés par rapport l'extrait aqueux froid de noix de muscade qui possède des effets antifongiques relativement faibles.

Les résultats des test phytochimique révèlent que les extraits aqueux froid et chaud de *noix de muscade* sont riches en métabolites secondaires : Polyphénoles sous forme des Tannins, Flavonoïdes, Terpènes et Saponosides. Ces substances jouent un rôle active contre les champignons.

Concernent l'activité antifongique, L'espèce le plus sensible par l'extrait aqueux chaud est *A. Ochraceus* et on montre que l'effet d'extraits aqueux de *Myristica fragrans* étaient efficace pour inhiber partiellement la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores d'*A. Ochraceus*.

Subséquemment, nous pouvons conclure de cette étude que les différents extraits aqueux froid et chaud de noix de muscade peuvent être considérées comme une alternative des agents conservateurs très prometteurs pour l'industrie alimentaire contre les champignons toxiques, responsable d'altérations des aliments, par conséquent permet d'augmenter la durée de vie des aliments.

Références bibliographiques

Nedjah, I, ‘’Changements physiologiques chez des plantes (Blé dur *Triticum durum* Desf.) exposées à une pollution par un métal lourd (plomb)’’, Thèses de doctorat, département de biologie, Université BADJI Mokhtar de Annaba, 2015.

Godon, B., 1991. Biotransformation des produits céréaliers. Technique & documentation Lavoisier, Paris, pp. 221.

Cheftel, J.C & Cheftel, H., 1977. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 105-130.

Doumandji, A., Doumandji-Mitiche, B. & Salah Eddine, D., 2003. Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, pp. 1-22.

Imprimerie Firmin,1972-DIDOT.- PARIS - MESNIL - IVRY- 6918 Édition na 415 - Dépôt légal fertrimestre 1972 p:98,99

Aurjau (Ph.). 1964. — *Étude comparée du développement reproductif de quatre variétés de blé dur (Triticum darum* Desf.). Thèse Doc. Fac. Sci. Paris, 155 p.

Blanchard (M.). 1960. — Le blé dur dans le monde. Comment distinguer le blé dur du blé tendre au cours des analyses internationales de Semence. — *C. R. Assoc. Int. Essais Semence,* 25, 234-246.

Feillet.P. (2000). Le grain de blé. INRA.Pris.N°280168v.p :88, 81, 82, 83,199•

Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R., Gornicki, P., (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoA caroxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploidy wheat. Proceedings of the national academy ofscience of the USA 99: 8133-8138.

Levy, A.A., and Feldman, M., (2002). The impact of polyploidy on grass genome evolution. Plant physiology 130: 1587-1593.

Mac Key, J., (2005). Wheat: Its concept, evolution, and taxonomy. In: Conxita.

Druvefors U.A. (2004). Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala* Doctoral thesis. University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, Department of Microbiology. Agraria.p: 44 .

Chawla K. (1984). Management of Cereal Grain in Storage. AGRI-FACTS. Practical Information for Alberta's Agriculture Industry. p: 1-5.

Molinie A., Faucet V., Castegnaro M and Pfohl-Leszkowicz A. (2005). Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for theircontent in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *F. Chem*. p: 391-400.

Duron B. (1999). Le Transport Maritime des céréales. Mémoire pour le D.E.S.S."Transports maritimes et aériens".Option Droit maritime et Droit des transports.Faculté de droit et de science politique d'aix-marseille. p:81.

Doumandji A., Doumandji-mitiche B., Salaheddine D. (2003). Cours de technologie des cereales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, p: 1-22.

Afnor S (1986). Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2emeEd, Lavoisier TEC et DOC, Paris, p: 250-263

Multon J.L. (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique et Documentation, Paris Apria.p: 576.

Magan N., Hope C.V. and Aldred D. (2003). Post – harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. Euro. J. Plant. Pathol 109, p:723- 730.

Deàk Tibor. (2008). Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press. Second Edition. 325P. 46. Dendy D.A.V., Dobraszczyk (2000). Cereals and Cereal Products: Technology and Chemistry. Springer; 370P

Adams Martin R., Moss Maurice O. (2008). Food microbiology. RSC Publishing. The Royale Society of Chemistry. Third Edition; 463P.

Sauer D.B., Storey C.L., Ecker O., Fulk D.W. (1982). Fungi in U.S. Export wheat and corn. Postharvest Pathology and Mycotoxins. Vol 72., 11: 1449.

Zillinsky F.J. (1983). Common diseases of small grain cereals. A guide to identification. CIMMYT; 141P.

Roberts T.A. (2005). Microorganisms in foods. Microbial Ecology of food Commodities. Second Edition. Springer; 776P.

Godon B. et Loisel W. (1997). Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. Edition Technique et Documentation Lavoisier., Paris; 819 P.

Mathew Shiju., Thomas George., Tufail Ahmad. (2011). An Evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. Nepal Journal of Biotechnology.,Vol 1: 9-13.

Cahagnier B. (1996). Céréales et produit dérivé In « microbiologie alimentaire » tome 1 « aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». Edition Technique et Documentation Lavoisier., Paris : 392-414.

Druvefors Ulrika Adel., Schnürer Johan. (2004). Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. FEMS yeast Research.Vol 5: 373-378

Petersson S., Schnürer J. (1995). Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by Pichia anomala, Pichia guilliermondii, and

Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol. Appl. Environ. Microbiol. 61(3):1027-1032.

Richrad-Molard M. (1998). Microbiologique des céréales et des farines In « Les industries de première transformation des céréales. Edition Techniques et Documentation Lavoisier., Paris : 159 -173.

Kräuter in Garten und Küche, 1988 Lingen Verlag, Köln http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Muskatnuss http://www.drug-infopool.de/rauschmittel/muskatnuss.html 24.01.2018

Razak, M.F., Aidoo, K.E., Candlish, A.G., 2009. Mixed herbs drugs inhibitory. effect on growth of the endogenous myclflore and afataxion production Mycopathologie p: 167-273-26.

Sheng-Hsien, L., Ku-Shang, C., Min-Sheng, S., Yung-Sheng, H. &Shang-Der, J., 2007. Effect of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *food contro* **18,** 1547-1554.
.

Bekhechi-Benhabib, C., 2001. Analyse d'huile essentielle *d'Ammoïdes verticillata (Nûnkha*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Algérie.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3eme Ed, Tec &Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.

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.

Malec, L.S. & Pamilio, A.B., 2003. Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* **1,** 30-38.

Oloyede, O.I., 2005. Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*, *Pakistan journal of nutrition* **4,** 379-381.

Koffi, N., Beugré, K., Guédé, N., Zirihi, D. & Laurent, A., 2009.

Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* **6 (1),** 1-15.

Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N. & Vahidipour, H.R., 2003.
Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82.

Pitt, J.I., 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* **65,** 1135-1157.

Ramirez, C., 1982. Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Kordali S., Cakir A., Zengin H.& Duru M. E.,2003. Antifungical activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*. 74,164-167.

Kemassi et Azouzi, 2017.Etude de la potentialité antifongique de l'extrait aqueux d*'Asphodelus tenuifolius* sur quelques champignons des céréales. P

Mohammedi, 2013 : Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. P 84

Kordali S., Cakir A., Zengin H.& Duru M. E.,2003. Antifungical activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*. 74,164-167.

Mlaiki A., 1970. Pourriture à *Gleosporium* des pommes ''Golden Delicious'' au cours de leur conservation. Ann. INRAT., 43 :P 15-27

Amadi J.E, Adeleke E.E., Olahan 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

Pfohl-Leszkowicz, A., 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris, pp. 478.

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.

Amadi J.E, Adeleke E.E., Olahan 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

Bassou K .2007. Efficacités antibactériennes et antifongques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte Mentha Spicata L'issuede la région de ouargla sur quelque germe pathogène : Echeichia coli, Pseudomonas aeruginsa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et ccandida albicans. Etude supérieures, Université de Kasdi Merbah Ouargla. 69.

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.

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.

Surget, A., et Barron, C., 2005. Histologie du grain de blé, Industrie des céréales 145, 4-7.

Devi Diksa I Tacouri, Deena Ramful-Baboolall, Daneshwar Puchooa., 2013. In vitro bioactivity and phytochemical screening of selected spices used in Mauritian foods; 3(4):253-261.

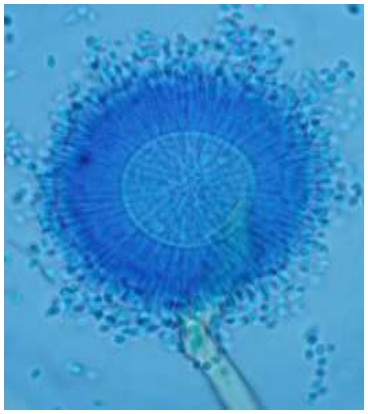
Sibi G1, Apsara V1, K. Dhananjaya1, K.R. Ravi Kumari and H. Mallesha2 1R., 2013. PHYTOCHEMICAL AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SPICES AGAINST FOOD BORNE BACTERIA WITH SPECIAL REFERENCE TO PARMELIA PERLATA. VOL.2 (2): 145-149. ISSN 2278 – 9103.

Devi Diksa I Tacouri, Deena Ramful-Baboolall, Daneshwar Puchooa., 2013. In vitro bioactivity and phytochemical screening of selected spices used in Mauritian foods; 3(4):253-261.

Cowan M., 1999. Plant products as antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev,12 : 564-582

Annexes

Annexe 01:l'aspect des souches fongique testé



A.niger ***A.terrus*** ***A. Ochraceus***

Annexe 02: composition du milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) ,Eau physiologique et Suspension sporale

- Pomme de terre……200g
- Glucose …….20g
- Agar- Agar……15g
- Eau distillée ……..1000ml
- pH …….5.6±0.2

Eau physiologique

-NaCl…….. 9 g

-Eau distillée…… 1000 ml

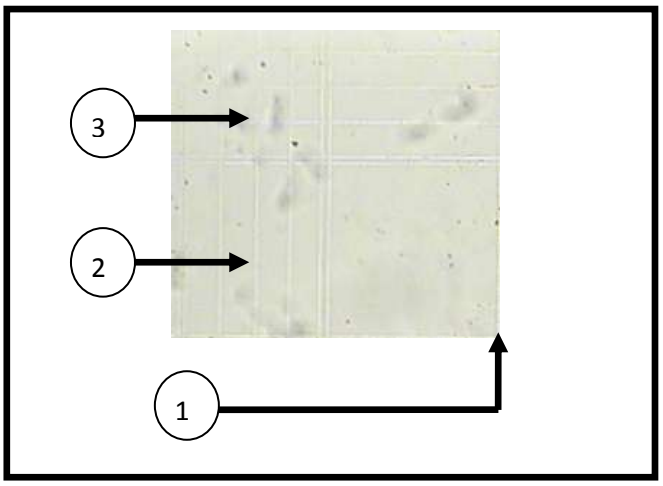
Suspension sporale

- Agar ……..0,1%

-Tween 80 ……..quelques gouttes

Annexe 03 : **Inhibition de la sporulation**

1- Le choix de cadrage de calcule



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

1. Inferieure 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

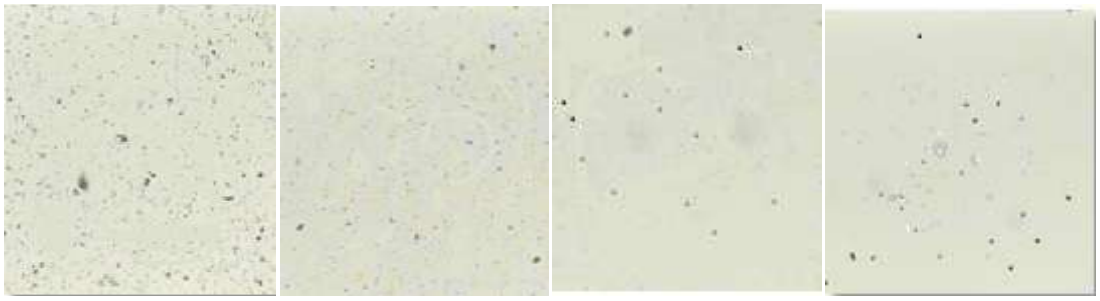
1. Si on a utilisé le grand cadre, la concentration sporale est la moyenne de spore x 2.5 x 10^5

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 x 10^6

2-production des spores d'extrait aqueux froid :

A.niger

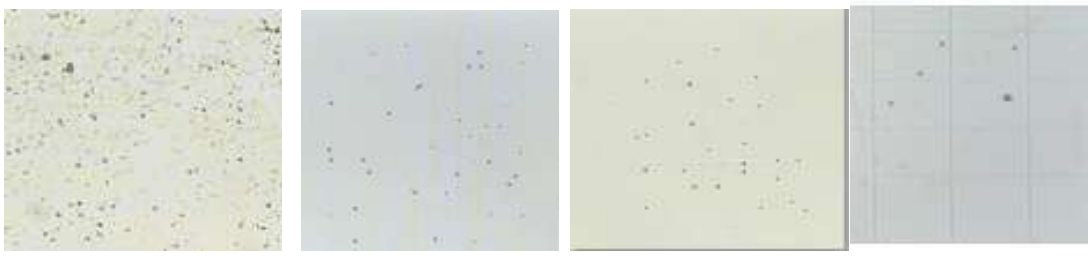


0% 20% 25% 30%

A.terrus

0% 20% 25% 30%

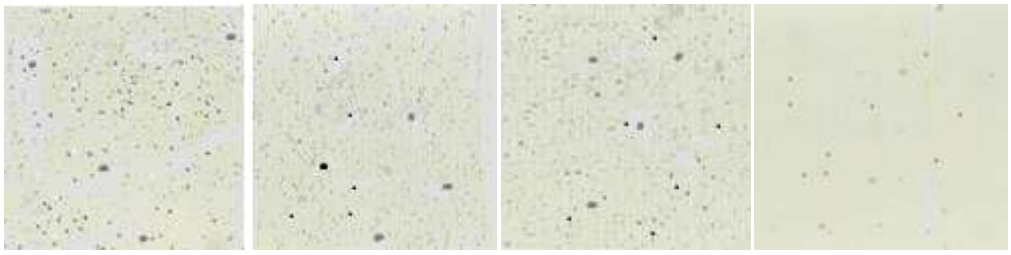
A. Ochraceus



0% 20% 25% 30%

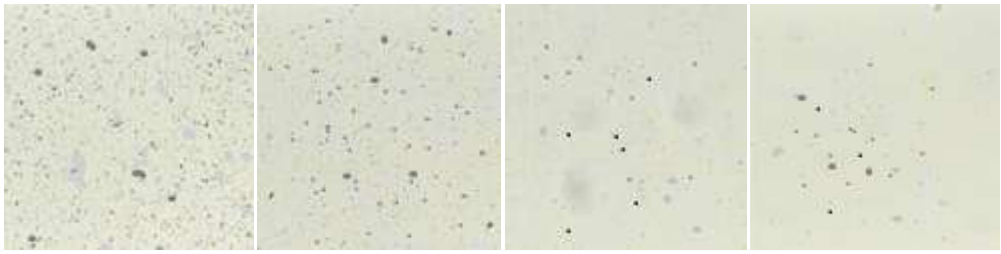
3-production des spores d'extrait aqueux chaud:

A.niger



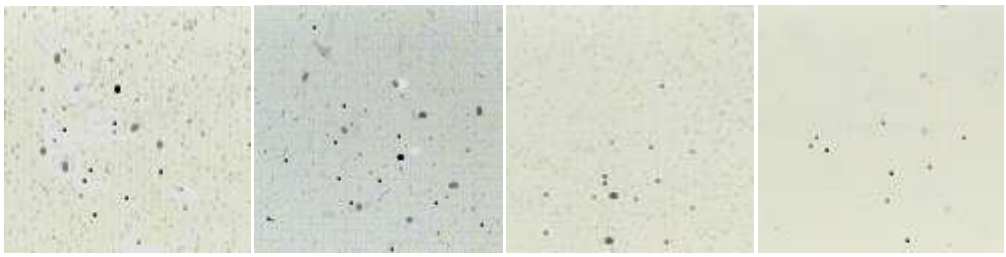
0% 20% 25% 30%

A.terrus



0% 20% 25% 30%

A. Ochraceus



0% 20% 25% 30%

الملخص:

دراسة النشاط المضاد الفطري للمستخلصات المائية "الباردة" و "الساخنة" من جوزة الطيب على بعض الفطريات الملوثة للقمح الصلب المخزن . هذا العمل يرتكز على نشاط المستخلصات المائية الباردة والساخنة لبذور نبات جوزة الطيب ضد بعض الفطريات وسمومها الملوثة للقمح الصلب المخزن لاجل استخدامها كحافظ غذائي بعد تحضير المستخلصات المائية الباردة والساخنة كانت النتائج المتحصل عليها هي ان مردود المستخلص المائي الساخن اكثر فعالية بالمقارنة مع المستخلص البارد بنسبة تقدر ب34.2% . بينما المستخلص المائي البارد فقد قدر مردوده ب 27.32% .وقد تم تقييم نشاط المستخلصات المائية الباردة والساخنة لجوزة الطيب بتراكيز مختلفة (0، 20، 25 و30٪) على النشاط المضاد لثلاثة فطريات *A ochraceus*، *A. niger*، *A. terreus*. وقد اظهرت النتائج ان اكثر الانواع حساسية هي *A. ochraceus*. بالمستخلص المائي الساخن وعند اقصى تركيز 30%مع معدل تثبيط لنمو يقدر ب 80.33% يليها *A. terreus*بنسبة 60.25 % و *A. niger* بنسبة 40.16%.كما ركز عملنا أيضا على دراسة الاختبار الكيميائي لأجل التعرف على المركبات الكيميائية الموجودة في المستخلص المائي البارد والساخن لنبات جوزة الطيب، حيث تبين وجود كل من المركبات التالية: القلوبيدات , الفلافونويد , التنينات , الستيرويد , الصابونين وغياب الانثوسيانين، قلويدات. هذه المواد تلعب دورا حاسما في النشاط المضاد للفطريات .

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

Résumé :

L'étude de l'activité antifongiques des extraits aqueux « froid » et « chaud » de noix de muscade sur quelques moisissures contaminants le blé dur stocké.

Ce travail est basé sur l'activité d'extrait aqueux froide et chaud de plante de noix de muscade contre certains champignons contaminés le blé dur stocké pour l'utilisation comme conservateur alimentaire, après la préparation d'extrait aqueux froide et chaud les résultats obtiennent, ce que l'extrait aqueux chaud plus efficace par rapport au froid extrait par une rendement 34. 2%, tandis que l'extrait aqueux de résonne à froid a été estimé à 27,32%. On a évalué l'activité des extraits aqueux de noix de muscade chaud et froid avec différentes concentrations (0, 20, 25 et 30%) sur l'activité de 3 champignons les quelles *A.ochraceus, A. Niger, A. terreus*. Les espèces les plus sensibles étaient *A. ochraceus* par l'extrait aqueux chaude à la concentration maximale de 30% avec une taux d'inhibition est estimé à 80,33%, suivi par *A. terreus* par 60,25% et *A. Niger* par 40,16% .Notre travail a également porté sur l'étude des tests photochimiques pour identifier des composés chimiques présents dans l'extrait aqueux froide et chaude de noix de muscade, qui montre la présence de chacun des composés suivants : stéroïdes, tannins, flavonoïdes, saponines et l'absence d'Anthocyanes, alcaloïdes. Ces substances jouent un rôle déterminant dans l'activité antifongique.

Mots clés : Extrait aqueux, Noix de muscade, tests photochimiques, blé dur, Activité antifongique, *A. ochraceus, A. niger, A. terreus*.

Abstract:

The study of the antifungal activity of "cold" and "hot" water extracts of nutmeg on some of the fungus contaminated with stored steel wheat.

This work is based on the activity of cold and hot water extracts of nutmeg seeds against some fungi and their contaminated toxins for solid wheat stored for use as a food preservative after the preparation of cold and hot water extracts. The results obtained were that the yield of the hot water extract was more effective than the cold extract. While the cold water extract was estimated at 27.32%. The cold and hot water extracts of nutmeg were evaluated with different concentrations (0, 20, 25 and 30%) on the activity of 3 fungus *A. ochraceus, A. niger, A. terreus*. The most sensitive species were *A. ochraceus*. With a maximum concentration of 30% with a growth inhibitor of 80.33% followed by *A. terreus* by 60.25% and *A. niger* by 40.16%. Our work also focused on studying the chemical test to identify the chemical compounds found in the cold and hot water extract of the plant Nutmeg, where the presence of each of the following compounds: Clavids, flavonoids, dragons, steroids, soap and absence of anthocyanins, alkaloids. These substances play a crucial role in antifungal activity.

Keywords: aqueous extract, phytochemical tests, solid wheat, antifungal activity, *A. ochraceus, A. niger, A. terreus*