

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES
TECHNOLOGIES AGROALIMENTAIRES

I.N.A.T.A.A.

Département de Biotechnologie Alimentaire

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences
Alimentaires, option Biotechnologie Alimentaire

Présenté par : **ZOUAOUI Nassim**

**Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique
dans le grain de blé dur**

Soutenu le :

Devant le jury :

Président : KACEM CHAOUCHE N. Professeur Faculté des S.N.V., U.M.C.

Rapporteur : BARKAT M. M. C. I.N.A.T.A.A., U.M.C.

Examinatrices : KHARROUB K. M. C. I.N.A.T.A.A., U.M.C.

BEKHOUCHE F. M. C. I.N.A.T.A.A., U.M.C.

Année universitaire 2011-2012

Remerciements

Au nom de Dieu, le miséricordieux, le tout puissant, je lui rends grâce pour m'avoir apporter sérénité et patience, que sa lumière nous guide vers lui, et que son nom soit l'objet de notre adoration.

*Tout d'abord, je tiens à remercier Madame **BARBAT Malika** pour m'avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance et ses encouragements mais surtout pour sa générosité dans le travail, qu'elle trouve en ces mots toute ma gratitude.*

Mes remerciements sont adressés aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

*Mr. le professeur **KACEM-CHAOUCH E** qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury*

*Mme **BEKHOUCHE** qui a eu l'amabilité de participer à ce Jury*

*Mme **KHARROUB** qui a bien voulu examiner ce travail*

*Je tiens à remercier mes collègues singulièrement **Mlles DJABALI, AIAD, LAKSIR, BOUCHEFRA, ZOUBIRI, KARMICH,...** Mesdames **BACHTERZI,...** et, Messieurs **GOMRI, BOUGERRA, SAOUDI, GAGAOUA, BOUASELA, BENSALÉM, CHEMACHE, MAZROUA, BOUFEDECHE,...** pour leur aide inestimable, mais aussi pour leur amitié précieuse, qu'ils trouvent ici les plus sincères marques d'affection.*

*Je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux Messieurs **MALLOL, GASSI, BOUKEHIL, ACHOU,..** qui m'ont apporté leur aide et qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire et aussi pour leur amitié précieuse.*

*Un grand Merci à **Ma famille** et surtout mes parents, qui m'auront permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui et qui continue de croire en moi malgré toutes les difficultés et tous les obstacles, Merci à **Ma fiancée...** pour leurs conseils et encouragements.*

*Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé de loin ou de près dans la réalisation de ce travail, en particulier **Mme AITKAKI A.**, le personnel de **CCLS**, de **l'ITGC**, de **la DCW Tébessa** et surtout **l'inspection de Ouenza.***

Zouaoui Nassim

SOMMAIRE

| | page |
|---|------|
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| INTRODUCTION | 1 |
| Partie 01. Synthèse bibliographique | |
| Chapitre I. Grain de blé | |
| I.1. Définition | 4 |
| I.2. Taxonomie | 4 |
| I.3. Composition histologique de grain de blé | 4 |
| I.4. Composition chimique | 5 |
| I.5. Stockage du blé | 7 |
| I.5.1. Stockage souterraine " MATMORA " | 7 |
| I.5.2. Stockage dans des greniers traditionnels (stockage domestique) | 8 |
| I.5.3. Stockage en sac | 8 |
| I.5.4. Stockage en silos | 8 |
| I.6. Facteurs favorisant l'altération du grain | 9 |
| I.6.1. Influence de l'humidité | 9 |
| I.6.2. Influence de la température | 9 |
| I.6.3. Influence de l'atmosphère confinée | 10 |
| I.6.4. Influence de la composition du grain | 10 |
| I.6.5. Influence de l'action des insectes | 10 |
| I.7. Microbiologie du blé | 11 |
| I.7.1. Moisissures | 11 |
| I.7.2. Levures | 12 |
| I.7.3. Bactéries | 12 |
| Chapitre II. Moisissures | |
| II.1. Caractères généraux | 13 |
| II.2. Classification | 13 |

| | |
|---|----|
| II.3. Modes de reproduction | 15 |
| II.3.1. Reproduction asexuée | 15 |
| II.3.2. Reproduction sexuée | 16 |
| II.4. Facteurs influençant le développement des moisissures | 17 |
| II.4.1. Facteurs nutritifs | 17 |
| II.4.2. Facteurs environnementaux | 17 |
| II.4.2.1. Activité d'eau (A_w) | 17 |
| II.4.2.2. Température | 18 |
| II.4.2.3. Oxygène | 18 |
| II.4.2.4. pH | 18 |
| | |
| Chapitre III. Polyphénols | |
| III.1. Définition | 19 |
| III.2. Classification | 19 |
| III.2.1. Acides phénoliques | 19 |
| III.2.2. Flavonoïdes | 21 |
| III.2.3. Tanins | 22 |
| III.2.4. Stilbènes | 22 |
| III.2.5. Lignanes | 22 |
| III.2.6. Lignines polymères | 22 |
| III.3. Propriétés biologiques des polyphénols | 23 |
| III.3.1. Activité anti-oxydante | 23 |
| III.3.2. Activité antibactérienne et antifongique | 24 |
| III.4. Formes d'existence des composés phénoliques <i>in vivo</i> | 27 |
| III.4.1. Complexation polyphénols- polysaccharides | 27 |
| III.4.2. Complexation polyphénols- Protéines | 28 |
| III.4.3. Complexation polyphénols- polyphénols | 29 |
| III.5. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols | 30 |
| III.5.1. Effet variétal | 30 |
| III.5.2. Effet de la transformation technologique | 30 |
| III.5.3. Conditions de culture | 31 |
| III.5.3.1. Lumière du soleil | 31 |
| III.5.3.2. Température | 31 |

| | |
|--|----|
| III.5.3. Stress hydrique | 32 |
| III.5.4. Effet de stockage | 32 |
| III.6. Composés polyphénoliques du grain de blé dur | 33 |
| III.6.1. Nature et teneur | 33 |
| III.6.2. Compartimentage ou localisation dans la plante | 34 |
| III.6.3. Compartimentage ou localisation dans le grain | 34 |
| III.7. Méthodes d'extraction, de dosage et d'identification des composés phénolique | 35 |
| III.7.1. Méthodes d'extraction | 35 |
| III.7.2. Méthodes de dosage et d'identification | 36 |
| | |
| Partie 02. Matériel et Méthodes | |
| II.1. Matériel végétal | 37 |
| II.2. Méthodes | 37 |
| II.2.1. Détermination de l'humidité | 37 |
| II.2.2. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux | 38 |
| II.2.2.1. Extraction des polyphénols totaux | 38 |
| II.2.2.2. Evaluation des polyphénols totaux | 40 |
| II.2.3. Analyse mycologique | 41 |
| II.2.3.1. Techniques d'énumération | 41 |
| II.2.3.2. Isolement et purification des moisissures | 41 |
| II.2.3.2.1. Méthode directe | 41 |
| II.2.3.2.2. Etude des caractères macroscopiques | 42 |
| II.2.3.2.3. Etude des caractères microscopiques | 42 |
| II.2.3.2.4. Purification et conservation | 43 |
| II.2.4. Evaluation de l'activité antifongique | 43 |
| II.3. Etude statistique | 44 |
| | |
| Partie 03. Résultats et discussion | |
| III. Résultats | |
| III.1. Evaluation du taux d'humidité et de la teneur en polyphénols totaux | 45 |
| III.1.1. Taux d'humidité | 45 |
| III.1.2. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux | 46 |
| III.1.2.1. Rendement en extrait sec | 46 |

| | |
|---|----|
| III.1.2.2. Dosage des polyphénols totaux | 47 |
| III.2. Analyse mycologique | 49 |
| III.2. 1. Isolement des moisissures | 49 |
| III.2. 2. Identification des genres | 51 |
| III.2. 2.1. Etude macroscopique | 51 |
| III.2. 2.1.1. variété MBB | 52 |
| III.2. 2.1.2. variété CIRTA | 54 |
| III.2. 2.1.3. variété VITRON | 56 |
| III.2. 2.1.4. variété SIMETO | 58 |
| III.2. 2.2. Etude microscopique | 60 |
| III.2. 2.2.1. Variété MBB | 60 |
| III.2. 2.2.2. Variété CIRTA | 62 |
| III.2. 2.2.3. Variété VITRON | 64 |
| III.2. 2.2.4. Variété SIMETO | 66 |
| III.3. Effet antifongique des extraits polyphénoliques | 69 |
| III.3.1. Souche <i>Alternaria sp.</i> | 69 |
| III.3.2. Souche <i>Rhizopus sp.</i> | 70 |
| III.3.3. Souche <i>Aureobasidium sp.</i> | 72 |
| III.3.4. Souche <i>Bipolaris sp.</i> | 73 |
| III.3.5. Souche <i>Fusarium sp.</i> | 75 |
| III.3.5. Souches <i>Aspergillus sp.</i> et <i>Penicillium sp.</i> | 76 |
| III.4. Test de corrélation | 77 |
| IV. Discussion | 78 |
| CONCLUSION | 83 |
| Références bibliographiques | |
| Annexes | |
| Résumés | |

LISTE DES FIGURES

| | Page |
|---|------|
| Figure 01. Coupe d'un grain de blé (Feillet, 2000)..... | 5 |
| Figure 02. Représentation schématique de quelques types de spores (Prescott <i>et al.</i> , 2003)..... | 15 |
| Figure 03. Reproduction des moisissures (Meyer <i>et al.</i> , 2004)..... | 16 |
| Figure 04. Structures chimiques de : (A) l'acide férulique, (B) l'acide p -coumarique (Ralphe et Helm, 1993)..... | 21 |
| Figure 05. Structure générique d'une molécule de flavonoïdes (Balasundram <i>et al.</i> , 2006)..... | 21 |
| Figure 06. Structures chimiques de l'acide férulique et l'acide p -coumarique reliés avec l'arabinose (Ara), le xylose (Xyl) et le glucose (Glc) par des liaisons ester (Ralph et Helm, 1993)..... | 28 |
| Figure 07. Structure secondaire de la paroi cellulaire : couplage croisé des radicaux des polysaccharides à précurseurs de la lignine par l'intermédiaire des acides : férulique (AF), p -coumarique (APC), p -hydroxybenzoïque (BA), sinapique (SA), et cinnamique (CA) (Bidlack <i>et al.</i> , 1992)..... | 29 |
| Figure 08. Extraction des polyphénols totaux..... | 39 |
| Figure 09. Evaluation des polyphénols totaux à partir de l'extrait sec..... | 40 |
| Figure 10. Pourcentage de contamination de chaque variété analysée..... | 50 |
| Figure 11. Pourcentage de contamination des échantillons sains et altérés des variétés analysées..... | 50 |
| Figure 12. Taux de contamination des échantillons analysés par les principaux genres isolés..... | 60 |
| Figure 13. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche <i>Alternaria sp.</i> : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO..... | 70 |
| Figure 14. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche <i>Rhizopus sp.</i> : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO..... | 71 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figure 15. | Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche <i>Aureobasidium sp.</i> : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO..... | 73 |
| Figure 16. | Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche <i>Bipolaris sp.</i> : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO..... | 74 |
| Figure 17. | Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche <i>Fusarium sp.</i> : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO..... | 76 |

LISTE DES TABLEAUX

| | Page |
|--|-------------|
| Tableau 01. Structures de l'éminent naturel des acides phénoliques (Robbins, 2003)... | 20 |
| Tableau 02. Nature et teneur des composés phénolique dans le grain de blé..... | 33 |
| Tableau 03. Codage des souches isolées et purifiées des échantillons sains et altérés de chaque variété..... | 43 |
| Tableau 04. Taux moyen d'humidité des échantillons analysés exprimé en pourcentage (%)...... | 45 |
| Tableau 05. Analyse des différences entre les taux d'humidité des variétés de blé analysés par le test de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$)..... | 45 |
| Tableau 06. Analyse des différences entre les taux d'humidité des échantillons analysés par le test de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$)..... | 46 |
| Tableau 07. Rendement moyen en extrait sec exprimé en g/10 g des échantillons analysés..... | 46 |
| Tableau 08. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$)..... | 47 |
| Tableau 09. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les échantillons (sains et altérés) des variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$)..... | 47 |
| Tableau 10. Teneur moyenne des polyphénols totaux exprimée en mg EAG/g d'extrait sec des grains entiers analysés..... | 48 |
| Tableau 11. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les variétés analysées pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0.05$)..... | 49 |
| Tableau 12. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les échantillons (sains et altérés) pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0.05$)..... | 49 |
| Tableau 13. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété MBB..... | 52 |
| Tableau 14. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées de l'échantillon altéré de la variété MBB..... | 53 |
| Tableau 15. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété CIRTA..... | 54 |
| Tableau 16. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de | 55 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| | l'échantillon altéré de la variété CIRTA..... | |
| Tableau 17. | Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété VITRON..... | 56 |
| Tableau 18. | Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon altéré de la variété VITRON..... | 57 |
| Tableau 19. | Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété SIMETO..... | 58 |
| Tableau 20. | Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon altéré de la variété SIMETO..... | 59 |
| Tableau 21. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété MBB..... | 61 |
| Tableau 22. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété MBB..... | 62 |
| Tableau 23. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété CIRTA..... | 63 |
| Tableau 24. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété CIRTA..... | 64 |
| Tableau 25. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété VITRON..... | 65 |
| Tableau 26. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété VITRON..... | 66 |
| Tableau 27. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété SIMETO..... | 67 |
| Tableau 28. | Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété SIMETO..... | 68 |
| Tableau 29. | Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche <i>Alternaria sp.</i> | 70 |
| Tableau 30. | Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche <i>Rhizopus sp.</i> | 72 |
| Tableau 31. | Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche <i>Aureobasidium sp.</i> | 73 |
| Tableau 32. | Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche <i>Bipolaris sp.</i> | 74 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tableau 33. | Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche <i>Fusarium sp.</i> | 76 |
| Tableau 34. | Matrice de corrélation (Pearson (n)) entre les différents paramètres analysés : le taux d'extrait sec, la teneur en polyphénols totaux, l'humidité et le pourcentage de contamination et la quantité des extraits polyphénoliques secs | 77 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | | |
|----------------------|---|--|
| A_w | : | Activité d'eau |
| ANOVA | : | ANalysis Of VAriance |
| CA | : | Cirta Altéré |
| CCLS | : | Coopérative des céréales et des légumes secs |
| CI 50% | : | Concentration d'inhibition de 50 % |
| CS | : | Cirta Sain |
| DMSO | : | Diméthylsulfoxyde |
| ES | : | Extrait sec |
| FAO | : | Food and Agriculture Organization |
| HPLC | : | High-Performance Liquid Chromatography |
| ICFM | : | International Commission for Food Mycology |
| MA | : | MBB Altéré |
| MS | : | MBB Sain |
| PC | : | Pourcentage de contamination |
| PDA | : | Potato Dextrose Agar |
| PI | : | Pourcentage d'inhibition |
| SA | : | SIMETO Altéré |
| SS | : | SIMETO Sain |
| TH | : | Taux d'humidité |
| TPT | : | Teneur en polyphénols totaux |
| VA | : | VITRON Altéré |
| VS | : | VITRON Sain |

Introduction

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins. En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière (Djermoun, 2009).

La qualité des aliments consommés est une des grandes préoccupations de toutes les sociétés. Si les qualités nutritionnelle et technologique sont devenues primordiales, la qualité sanitaire est également très importante. Les aliments et y compris les grains sont des milieux propices au développement des micro-organismes. L'infestation par les moisissures représente l'une des causes majeures d'altération des grains et des graines stockés, et leur importance est encore trop souvent sous-estimée. Les moisissures du stockage, peuvent amener à toute une série d'altérations, entraînant des pertes sur les plans technologique, commercial, hygiénique et nutritionnel (Multon, 1992). Selon la FAO, environ 5% de la production mondiale de céréales serait annuellement détérioré et perdu. Les pertes se répartissent de façons très inégales entre les différentes régions du globe. Les pays qui utilisent des technologies avancées, n'ont à déplorer qu'un pourcentage de perte faible, de 1 à 2 % ; inversement, dans les pays ne maîtrisant pas encore les technologies avancées, subissent jusqu'à 25 à 30 % de perte, ce qui est considérable, même si cela représente de bien moindres tonnages (Cahagnier, 1997).

Parmi les constituants du grain pouvant jouer un rôle dans sa défense contre le stress biotique et abiotique, figurent les polyphénols. Ils suscitent depuis quelques années un intérêt croissant de la part des industriels de l'agro-alimentaire. Des travaux ont montré que les polyphénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques de la plante. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Des études, peu nombreuses, mais encourageantes, ont été réalisées pour identifier les changements que peuvent apporter les agriculteurs à leurs pratiques pour accroître la teneur moyenne en polyphénols des grains et graines. En outre, des recherches de plus en plus nombreuses sont réalisées sur les mécanismes biologiques en vertu desquels les métabolites secondaires participent à la croissance saine des plantes et sur les manières de maintenir la teneur en polyphénols des aliments au moment de la récolte. Des techniques de cartographie génétique sont utilisées pour isoler les gènes responsables de la biosynthèse de certains polyphénols (Niggeweg *et al.*, 2004 ; Gall *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003).

Certains travaux notamment ceux de Lloyd *et al.* (2000) ont montré que les grains de blé contiennent des quantités élevées de différentes classes de composés phénoliques comme les acides phénoliques, les anthocyanidines, les quinones, les flavonoïdes et les composés phénoliques aminés. Le plus important polyphénol des plantes, sur le plan du volume, est la lignine (Daniel *et al.*, 1999).

Etant donné que ces composés jouent un rôle dans les mécanismes de défense, il est normal que les plus grandes concentrations se retrouvent à l'endroit des attaques initiales par des insectes ou des agents pathogènes fongiques ou bactériens, c'est-à-dire sur les téguments des grains. Selon Manach *et al.* (2004), l'acide férulique est le plus courant des acides phénoliques dans les grains des céréales. Il se concentre dans les parties extérieures du grain.

Durant le stockage, très peu de travaux ont abordé la relation entre l'infestation fongique et le potentiel phénolique du grain. Il nous a donc paru judicieux d'organiser ce thème autour de la recherche d'éventuelle corrélation entre la teneur en polyphénols totaux dans les grains de blé dur et la résistance à l'infestation fongique. Parmi les principaux aspects abordés dans cette étude, l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux des grains entiers et la recherche de principaux genres de moisissures contaminant ces grains en tenant compte de l'effet intra-variétal (échantillons sains et altérés de la même variété) et l'effet inter-variétal (échantillons appartenant à différentes variétés). En parallèle un test antifongique des polyphénols totaux, extraits des variétés de blé vis-à-vis des souches des moisissures isolées, a été réalisé *in vitro*.

Afin d'atteindre ces objectifs, outre l'introduction et la conclusion, le manuscrit est structuré en trois parties: la première partie expose une synthèse bibliographique, répartie en trois chapitres. Le premier chapitre met l'accent sur des généralités relatives au grain de blé. Le deuxième chapitre est consacré aux moisissures et le dernier chapitre traite les polyphénols. La deuxième partie résume le matériel et les méthodes mis en œuvre, l'extraction, le dosage des polyphénols totaux, l'isolement et l'identification des moisissures à partir des grains de blé dur et le test antifongique des extraits polyphénoliques des variétés analysées vis-à-vis des souches des moisissures isolées. La troisième partie regroupe les résultats obtenus suivis des discussions; elle récapitule l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux des variétés analysées de blé, l'estimation du pourcentage de contamination, l'identification des souches des moisissures isolées, l'évaluation du pouvoir antifongique des extraits phénoliques des variétés analysées vis-à-vis des souches des

moisissures isolées et la mise en évidence de corrélations entre la teneur en polyphénols totaux des grains de blé dur et la résistance à l'infestation par les moisissures.

Partie 01.
Synthèse
bibliographique

I.1. Définition

Le grain de blé constitue le fruit de la plante, c'est un fruit sec (caryopse) qui contient à l'intérieur la graine proprement dite. Il est de forme ovale, arrondi à ses deux extrémités qui sont inégales et de grosseur variable, son examen révèle : une face dorsale plus ou moins bombée et une face ventrale, comportant un sillon profond. À sa partie supérieure, se trouvent des courts poils qui forment la brosse. À sa partie inférieure, visible sur la face dorsale, se trouve une légère dépression correspondante à l'embryon ou le germe (Calvel, 1984). La longueur du grain est comprise entre 5 et 9 mm, et le poids est compris entre 35 et 50 mg (Šramková *et al.*, 2009).

I.2. Taxonomie

Le blé est une monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Graminées. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscent, constitué d'une graine et de téguments. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) mais il existe de nombreuses autres espèces de *Triticum* qui se différencient par leur degré de ploïdie et par leur nombre de chromosomes (14, 28 ou 42). Le blé dur contient deux génomes AA et BB et 28 chromosomes (Feillet, 2000).

I.3. Composition histologique du grain de blé

Le grain de blé se compose d'un certain nombre de tissus avec des structures et des compositions spécifiques (Hemery *et al.*, 2007) comme il est illustré dans la figure 01. Le grain de blé est formé de trois parties : l'enveloppe ou le son (13 %), l'albumen (84 %) et le germe (3 %) (Boudreau et Ménard, 1992).

➤ **Le son :** est composé de plusieurs couches, qui protègent la partie principale du grain (Šramková *et al.*, 2009). Il est formé de six tissus différents : l'épiderme du nucelle, le tégument séminal ou la testa (enveloppe de la graine), les cellules tubulaires, les cellules croisées, le mésocarpe et l'épicarpe (Feillet, 2000).

➤ **L'albumen :** est constitué d'albumen amylicé et de couche à aleurone. Dans l'albumen amylicé se trouvent des cellules remplies de granules d'amidon dispersés au milieu d'une matrice protéique et dont les parois cellulosesiques sont peu visibles (Feillet, 2000).

➤ **Le germe :** est l'embryon qui donnera naissance à une future plante. Il est constitué de deux parties, l'axe embryonnaire d'une part, composé de cellules parenchymateuses mérismatiques, dont les

parois sont fines et non lignifiées, et d'autre part le scutellum (cotylédon), qui fonctionne comme un organe de stockage (Pomeranz, 1987; Feillet, 2000).

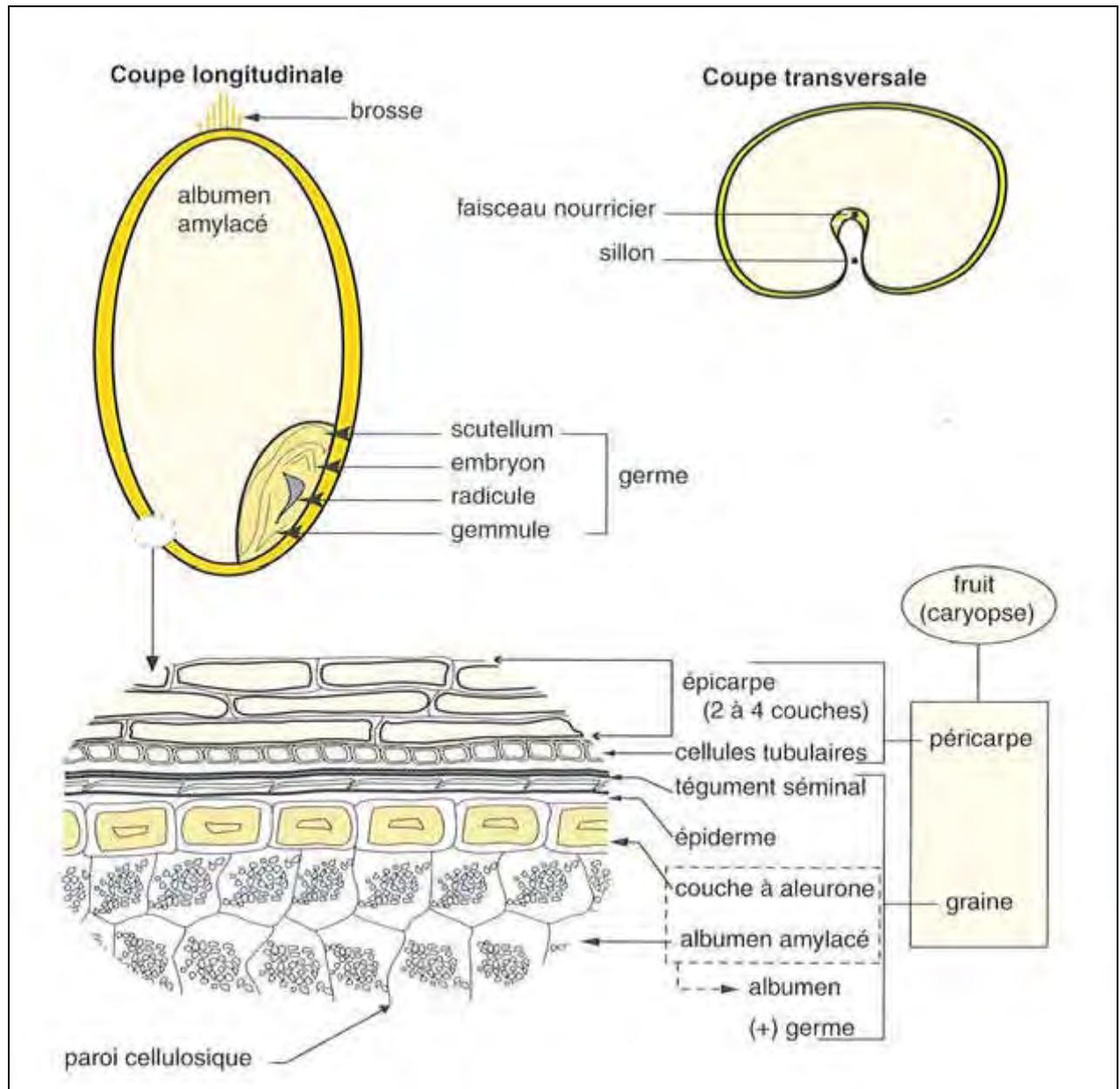


Figure 01. Coupe d'un grain de blé (Feillet, 2000)

I.4. Composition chimique

La composition des différentes parties d'un grain de blé dépend d'un certain nombre de facteurs tels que le climat, la variété du blé, la nature de sol, les amendements et les techniques culturelles (Selselet-Attou, 1991).

Le grain de blé se compose principalement des glucides (65-75 % amidon et fibres), des protéines (7 – 12 %), des lipides (2 - 6 %), de l'eau (12 – 14 %) et des micronutriments (Hemery, 2007).

Le son de blé est riche en vitamines du groupe B et en minéraux, il est séparé de l'endosperme féculent pendant la première étape du fraisage. Afin de protéger le grain et l'endosperme, le son comporte des fibres insolubles dans l'eau. Les fibres représentent plus de la moitié de la composition du son (53%). La composition chimique de la fibre de son de blé est complexe, mais elle contient essentiellement la cellulose, les pentosanes et des polymères de xylose et d'arabinose, qui sont étroitement liés aux protéines (Šramková *et al.*, 2009). Le son de blé contient aussi des quantités importantes des acides phénoliques, de lignine et de certaines protéines. Les acides phénoliques présents dans la paroi cellulaire sont supposés jouer un rôle important dans la réticulation des polysaccharides avec d'autres composants de la paroi cellulaire, y compris la lignine grâce des liaisons ester et éther. La présence d'esters de l'acide férulique dans le son de blé a été révélée depuis un certain temps. L'acide férulique est estérifié à l'arabinose (unités d'arabinoxylane de la paroi cellulaire) et il est important dans l'aleurone, le péricarpe et les parois des cellules d'embryon. Plus récemment, l'acide dihydroférulique (DIFA) a été trouvé dans les tissus de blé (Parker *et al.*, 2005). Kim *et al.* (2006) ont montré que le contenu phénolique total du son de blé rouge est plus élevé que celui du blé blanc.

Selon Himi *et al.* (2005), la pigmentation du grain et de la coléoptile chez le blé est contrôlée par le locus R, situé sur les chromosomes homéologues du groupe 3, et par le locus Rc, situé sur les chromosomes homéologues du groupe 7. Chacun de ces gènes montre une hérédité monogénique. La pigmentation du grain serait due à des dérivés de catéchines ou de tanins alors que celle de la coléoptile proviendrait des anthocyanes. Il est connu que ces composés phénoliques sont synthétisés via la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Ces mêmes auteurs ont cloné des séquences partielles pour quatre gènes impliqués tôt dans cette voie de synthèse (*CHS*, *CHI*, *F3H* et *DFR*) chez le blé. L'expression de ces gènes a été examinée chez le grain en développement chez des lignées à grains rouges ou à grains blancs. Les gènes *CHS*, *CHI*, *F3H* et *DFR* étaient fortement induits dans le péricarpe chez les lignées à grains rouges tandis qu'aucune expression significative n'était décelée chez les lignées à grains blancs. Ces résultats montrent que le gène R est impliqué dans l'activation des premiers gènes de la voie de synthèse des flavonoïdes. Quant aux pigments de la coléoptile, les quatre gènes étaient exprimés dans les coléoptiles rouges alors que *DFR* n'était pas induit chez les coléoptiles blanches. Le gène Rc semble être ainsi impliqué dans l'expression du gène *DFR*. Les mêmes auteurs discutent de la possibilité que les gènes R et Rc soient des facteurs de transcription.

Les protéines et les glucides représentent chacun 16% de la matière sèche totale du son. La teneur en minéraux est plus élevée (7,2%). Les deux couches externes du grain (péricarpe et testa) se composent des cellules vides mortes. Les cellules intérieures de la couche d'aleurone du son sont

remplies de protoplastes vivants. Ceci explique le taux plus élevés des protéines et des glucides dans le son. Il y a une grande différence entre le taux de certains acides aminés dans la couche d'aleurone et ceux dans la farine. Le taux de glutamine et de proline est environ la moitié, alors que l'arginine est triple, l'alanine, l'asparagine, la glycine, l'histidine et la lysine sont doubles par rapport à ceux dans la farine de blé (Šramková *et al.*, 2009).

La couche à aleurone est riche en vitamines (B1, B2, B3, B6, B9 et E) et en minéraux (P, K, Mg, Mn et Fe) ; elle a, par sa richesse en métabolites, un rôle nourricier et par sa structure un rôle de protection (Pomeranz, 1988).

L'endosperme contient principalement des réserves alimentaires, qui sont nécessaires à la croissance de la plantule, il est riche en énergie (amidon). Outre les glucides, l'endosperme farineux contient des lipides (1,5%) et des protéines (13%) (les gliadines et gluténines sont les principales protéines de réserve du grain, les autres protéines du grain sont des protéines de structure telles que les albumines et les globulines). Le contenu en minéraux (cendres) et en fibres alimentaires sont faibles et valent respectivement 0,5% et 1,5% (Šramková *et al.*, 2009). La texture d'endosperme (la dureté ou la douceur du grain) est également l'un des principaux déterminants de la qualité du blé final. En se basant sur la dureté du grain, le blé peut être classé en blé tendre ou dur. La dureté du grain est principalement contrôlée par le gène (*Ha*), qui est situé sur le bras court du chromosome 5D (Chen *et al.*, 2007).

L'embryon contient des protéines (25 %), des lipides (8-13%) et des glucides mais pas d'amidon (Shewiy *et al.*, 1999). Le germe est riche en minéraux et vitamines (Godon et Willm, 1991).

I.5. Stockage du blé

Le stockage des grains est une opération complexe qui demande la prise en compte de multiples paramètres (température, humidité, etc.) lors des différentes étapes, entre la récolte et l'expédition (Niquet, 2006).

I.5.1. Stockage souterrain " MATMORA "

Le stockage souterrain des céréales est une technique largement utilisée en milieu rural dans plusieurs régions céréalières du monde en général (Bartali et Debbbarh, 1991). La technique souterraine de stockage des céréales est appelée " MATMORA ". Elle consiste à enfouir le produit dans le sol dans une cavité d'une capacité moyenne de 5 tonnes environ. La "MATMORA" présente une forme cylindrico-conique, cylindrique, sphérique ou amphorique (FAO, 1994 ; Bartali *et al.*, 1989) revêtue d'un enchevêtrement de paille de blé et d'orge où bien par des feuilles de plastique,

celles-ci jouent un rôle important dans la réduction des risques de détérioration du grain stocké par les eaux souterraines. Les " MATMORA " sont situées soit dans la maison soit à l'extérieur, proches ou éloignées de l'habitation, parfois dans un milieu protégé ou fortifié (Kanafani, 1994 ; Bartali et Debbarh, 1991).

I.5.2. Stockage dans des greniers traditionnels (stockage domestique)

Les grains de blé sont conservés en épis ou en vrac. Ils sont généralement surélevés pour éviter l'attaque des rongeurs. L'infestation par les insectes est fréquente. Les producteurs essaient d'y faire face en mélangeant les grains avec de la poudre insecticide. Ces greniers ont généralement une forme cylindrique avec un chapeau au-dessus. La capacité varie de 3 à 7 Tonnes. On les retrouvait très souvent au milieu des champs. Dans tous les cas, on peut dire que ces greniers n'assurent pas une bonne protection phytosanitaire (Ndiaye, 1999). Il y a plusieurs types de greniers selon la matière de construction : greniers à base de terre, greniers à armature de bambou et greniers en paille (Kodio, 1989).

I.5.3. Stockage en sac

Les grains de blé sont stockés dans des sacs fabriqués en toile de jute, doublés par un sac plastique afin d'assurer normalement une très bonne conservation. Il faut que les grains soient secs, que le sac plastique intérieur ne soit pas percé, qu'il n'y ait pas de fumigeant et que le sac soit bien attaché (Ndiaye, 1999 ; Ntsam, 1989). Les sacs doivent être maintenus hors du sol pour éviter la détérioration par la translocation de l'eau et / ou les termites. Des plates-formes basses, des bâches ou des feuilles de plastique peuvent servir à cette fin, mais si il ya un risque de dommages par les rongeurs ou autres animaux, s'il y a un risque de pluie pendant la période de stockage, les sacs devraient être couverts avec des bâches imperméables. Le besoin de méthodes chimiques de lutte antiparasitaire ne doit pas survenir si la période de stockage est courte (FAO, 1994).

I.5.4. Stockage en silos

Aujourd'hui, le stockage en silos est un moyen généralisé de conservation et élimine les problèmes occasionnés par l'encombrement et la manipulation superflue des sacs. En général, les silos sont en métal où bien en béton armé, de forme cylindrique et disposés en ligne ou en damier. La méthode de stockage par transilage est la plus populaire. Les silos sont munis de thermocouples qui indiquent les températures du blé aux différents paliers des cellules et d'une télécommande qui avertit, à l'aide d'alarmes ou de voyants lumineux sur le panneau électronique central, de la nécessité de transborder le blé. De plus, les moulins sont équipés d'un système d'aspiration central

et de cyclones de séparation pour assurer la récupération des poussières. Des prises d'aspiration sont installées aux endroits critiques (à la tête des silos et au-dessus de tous les transporteurs et machines) comme mesure préventive de pollution et d'explosion. Quant à la méthode de stockage effectuée en atmosphère renouvelée, l'aération est réalisée par un système de ventilation installé à la base même des silos en faisant circuler l'air extérieur ambiant (Bartali, 1995; Boudreau et Ménard, 1992).

I.6. Facteurs favorisant l'altération des grains

I.6.1. Influence de 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 les champignons (Vàsquez *et al.*, 2008). Elle favorise la respiration des grains et accentue en conséquence le dégagement de chaleur au sein des grains stockés. Il est généralement admis que le dégagement de chaleur double pour chaque accroissement de 1.5 % de l'humidité du grain et donc que la durée probable de conservation d'un stock est diminuée de moitié. Les altérations sont accentuées par le fait que les grains humides favorisent le développement des micro-organismes présents à la surface du grain (Cruz *et al.*, 2002). En effet à une humidité inférieure, les champignons ne poussent pas, mais à environ 14% ou légèrement au-dessus, la croissance fongique a lieu (Hoseney, 1994). Les moisissures du genre *Penicillium* ne se développent pas dans les lots de blé maintenus à 14% d'humidité et à un taux relatif interstitiel de 70% (Boudreau et Ménard, 1992). Des activités lipolytiques et protéolytiques plus élevées sont liées à la plus forte teneur en humidité, ce qui conduit encore à une perte en nutriments (protéines et lipides) (Butt *et al.*, 2004).

I.6.2. Influence de 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 (Kusińska, 2001). Elle intervient d'une part sur la valeur de l' A_w et d'autre part, sur les vitesses des réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes (Richard-Molard, 1998). Une augmentation de température se traduit par un dégagement de chaleur au sein de la masse des grains qui double pratiquement pour chaque élévation de 5°C de la température, ceci jusqu'à environ 28°C (au-delà l'effet diminue); la durée probable de conservation d'un stock est ainsi diminuée de moitié (Cruz *et al.*, 2002). Au cours de la conservation, plus la température est élevée et plus les réactions biologiques des microorganismes sont rapides (Multon, 1982).

I.6.3. Influence de l'atmosphère confinée

La respiration des grains stockés dans une structure étanche appauvrit l'atmosphère interstitielle en oxygène et l'enrichit en gaz carbonique. Cette modification de la composition des gaz du milieu peut bloquer le développement des moisissures et détruire les insectes présents. Ce principe est appliqué dans les méthodes de stockage souterrain (fosses) pratiquées de manière traditionnelle. Cependant, si les grains sont emmagasinés avec une humidité excessive, des risques de fermentation apparaissent et donnent lieu à des pertes importantes qui peuvent atteindre l'ensemble du stock (Cruz *et al.*, 2002).

I.6.4. Influence de la composition du grain

La structure anatomique des grains de blé, leur composition biochimique (Richard-Molard, 1998) et l'état physique, influent sur la croissance et l'activité des microorganismes (Poisson et Cahagnier, 1998). La zone du germe, biochimiquement plus riche que l'enveloppe ou l'amande amyliacée, constitue le meilleur point de départ pour la croissance des moisissures. Des travaux ont pu montrer que même à de très faible activité d'eau (0.75-0.85), les lipides neutres des grains dont le germe est riche, ne présentent pas une source de carbone accessible à la lipase fongique et constituent sans doute des éléments essentiels pour l'initiation de la croissance des moisissures xérotolérantes (Lesage, 1998).

I.6.5. Influence de l'action des insectes

Les plantes sont naturellement protégées contre les contaminations fongiques par leur cuticule et les grains par leurs enveloppes. Cependant, les dommages physiques causés par les insectes, les rongeurs ou les oiseaux aux plantes et aux grains facilitent la pénétration des spores et de ce fait le développement des moisissures (Jouany, 2007). Les coléoptères (*Sitophilus*, *Rhizopertha*, *Trogoderma*,...) et les lépidoptères (*Sitotroga*, *Ephestia* et *plodia*) sont les principaux ordres d'insectes parasites des stocks de grains. En plus de souiller le blé de ses détritits, l'insecte au stade adulte pond des œufs qu'il colle sur les grains ou qu'il introduit à l'intérieur par de petits trous qu'il perce à l'aide de ses organes buccaux. L'œuf va donner naissance à un petit ver ou une larve. Celle-ci se développe, mue pour donner naissance à une nymphe qui reste immobile, puis se transforme en adulte. Dans des conditions idéales de température (20°C) et d'humidité relative (80 %), les insectes se multiplient très rapidement (Boudreau et Ménard, 1992).

I.7. Microbiologie du blé

Depuis le moment de leur initiation au sein de l'épi jusqu'au passage au moulin ou à l'usine, les grains de blé sont soumis à des contaminations par les bactéries, levures, champignons parasites ou moisissures (Cahagnier, 1996).

I.7.1. Moisissures

Les moisissures constituent la cause essentielle des altérations d'origine microbienne dans les grains stockés, provoquant la mort des embryons (Boudreau et Ménard, 1992). Les genres et espèces composant la mycoflore seminicole des grains sont aujourd'hui rangés en trois grands groupes :

- **Flore de champ** : les céréales sont contaminées avant la récolte par une mycoflore dite "du champ" qui comprend un grand nombre d'espèces appartenant notamment aux genres *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Trichoderma*, etc. (Breton, 1990). Cette flore rassemble les moisissures à tendance phytopathogènes qui s'implantent sur le grain avant la récolte. Cette flore, hygrophile a besoin d'humidité relative très élevée pour se développer et régresse par conséquent toujours sur les grains stockés (Cahagnier, 1996).
- **Flore de stockage** : est composée d'espèces xérophiles adaptées à des substrats relativement secs, qui peuvent proliférer au cours du stockage lorsque l'activité de l'eau dépasse 65 à 70 %. Les principales moisissures qui la constituent sont des *Penicillium* et des *Aspergillus* ; elles ont un rôle déterminant dans l'altération des grains en cours de conservation, représentent un véritable danger et se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l' A_w sont élevées (Feillet, 2000).
- **La flore « intermédiaire »** est une troisième catégorie à comportement plus diversifié. Elle regroupe des germes capables d'un développement limité, en début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Parmi cette flore, nous avons *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor*. Les mucorales avec les levures *Candida* et *Torulopsis* sont les représentants habituels de cette flore intermédiaire dont la mise en évidence révèle très souvent un stockage en conditions confinées et trop humides (Godon et Loisel, 1997).

Selon Bariana et McIntosh (1993), des études sur le blé ont montré que la résistance des plantules contre la rouille de la tige, la rouille jaune striée, la rouille blanche des feuilles, est contrôlée par des gènes distincts. Les gènes de la résistance aux rouilles ont été respectivement désignés par *Sr38*, *Yr17* et *Lr37*, tandis que le gène codant pour la résistance à la rouille blanche a été postulé être le *Pm4b*. Les gènes *Sr38*, *Yr17* et *Lr37* sont montrés comme étant étroitement liés et

localisés de façon distale dans le bras court du chromosome 2A. Ces gènes révèlent également une étroite répulsion de linkage avec le gène *Lr17* et s'avèrent génétiquement indépendants des autres gènes connus comme étant localisés sur le chromosome 2A.

I.7.2. Levures

Les populations de levures dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les genres rencontrés : *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pischia*, etc. 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 de levures sont souvent le signe d'une humidité élevée à la récolte et /ou d'un pré-stockage humide avant séchage (Cahagnier, 1996).

I.7.3. Bactéries

Les bactéries, portées par les grains et provenant 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 toxigènes comme *Salmonella*, *Clostridium* ou *Staphylococcus*. À la récolte, les produits céréaliers sont toujours faiblement contaminés par les *Streptomycetaceae*, microorganismes que l'on connaît surtout pour leur aptitude à produire des antibiotiques, et dont les principaux représentants sur grains semblent être : *Streptomyces albus* et *Streptomyces griseus* (Cahagnier, 1996).

II.1. Caractères généraux

Le terme de « moisissures » n'a pas réellement de signification systématique; il est utilisé de façon empirique pour désigner tous les champignons microscopiques qui intéressent l'économie et l'environnement humains, de façon bénéfique ou néfaste (Roquebert, 2002).

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes : certains vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres encore sont des saprophytes qui se développent sur des déchets organiques ou contaminent les produits alimentaires (Meyer *et al.*, 2004). Les moisissures sont constituées de filaments ou hyphes, enchevêtrés pour former un « feutrage » (Baudry et Brézellec, 2006).

Selon Leyral et Vierling (2007), les moisissures peuvent être :

- Nuisibles, car agents d'altérations d'aliments ;
- Utiles, car intervenant dans la production d'aliments, d'antibiotiques, d'enzymes et dans diverses fermentations.

II.2. Classification

On distingue quatre classes de champignons en fonction de l'aspect des hyphes (cloisonnés ou non, lévuriformes ou non) et du mode de reproduction : Phycomycètes ; Ascomycètes ; Basidiomycètes et Deutéromycètes (Leyral et Vierling, 2007). A la méthode morphologique de classification se superposent de plus en plus des méthodes biochimiques, immunologiques et moléculaires tournant autour de l'amplification en chaîne par polymérisation (PCR) de l'ADN. Si de nombreux travaux sont en cours dans ce domaine, l'identification morphologique reste majoritaire et les analyses moléculaires sont appliquées surtout pour résoudre des problèmes de systématique et de phylogénie des champignons. Il existe cependant des « kits » d'identification mis au point pour des moisissures d'importance économique : phytopathogènes, pathogènes de l'homme ou productrices de mycotoxines dans le domaine de l'agro-alimentaire (Roquebert, 1998)

II.2.1. Phycomycètes

D'après Leyral et Vierling (2007), les Phycomycètes comprennent deux sous-classes :

- Les Oomycètes, caractérisés par la production d'oospores au cours de la reproduction sexuée et de zoospores (spores flagellées) en reproduction asexuée ;
- Les Zygomycètes, produisant des zygospores. Leur reproduction asexuée est assurée par des conidiospores ou des sporangiospores.

Les Oomycètes sont des espèces aquatiques ou parasites des végétaux supérieurs, alors que les Zygomycètes sont des espèces saprophytes ou parasites : les *Mucorales* (*Rhizopus*, *Phycomyces*, *Mucor*, etc.) font partie des Zygomycètes. Ce sont des agents de maladies des végétaux (Meyer *et al.*, 2004).

II.2.2. Ascomycètes

Les Ascomycètes sont caractérisés par la formation endogène des spores (ascospores) contenues dans l'asque. Ils se subdivisent en Hemiascomycètes dont les asques sont libres et qui correspondent essentiellement à des levures, et en Plectomycètes dont les asques sont groupés dans des réceptacles : apothécie, périthèce et cleistothécium. Les *Euascomycètes* regroupent de nombreux parasites des végétaux, mais aussi de nombreuses moisissures contaminant les produits alimentaires (*Aspergillaceae*). Certains, comme *A. fumigatus*, peuvent être responsables d'infections graves (Meyer *et al.*, 2004).

II.2.3. Basidiomycètes

Le nom basidiomycète provient d'une structure cellulaire caractéristique, la baside, impliquée dans la reproduction sexuée. La baside (du grec *basidion*, petite base) est produite au sommet d'un hyphes, elle a généralement la forme d'une massue. Les basidiospores sont formées par la baside et les basides sont rassemblées dans les fructifications appelées « basidiocarpes » (Prescott *et al.*, 2003).

II.2.4. Deutéromycètes

Les Deutéromycètes, encore appelés champignons imparfaits ou *fungi imperfecti*, sont caractérisés par un mycélium septé et par l'absence de reproduction sexuée connue pour un certain nombre d'entre eux. La dénomination, champignons mitospores (spores générées par mitose) met explicitement l'accent sur l'origine asexuée de la reproduction des espèces appartenant à ce groupe. La reproduction asexuée, caractérisée par la production de conidies, la nature des parois cellulaires et l'absence d'anses d'anastomose chez la plupart des Deutéromycètes, montrent que ces derniers sont des anamorphes d'*Ascomycota* ; très peu d'espèces sont des anamorphes des *Basidiomycota*. L'hétérogénéité des espèces, que les Deutéromycètes réunissent, explique qu'ils ne forment pas un phylum et que les taxonomistes les considèrent comme un groupe plutôt qu'un véritable taxon (Lepoivre, 2003).

II.3. Modes de reproduction

Tous les mycètes présentent une période de croissance végétative pendant laquelle leur mycélium exploite un substrat, cette étape est suivie par la reproduction sexuée ou asexuée. Presque tous les mycètes se reproduisent en formant des spores (Mathieu et Fonteneau, 2008). Les spores représentent la phase de conservation et de dissémination du champignon (Fontaine et al., 2007).

II.3.1. Reproduction asexuée

Le mode le plus commun de reproduction asexuée, est la production de spores (Figure 02). Les spores asexuées sont produites chez un mycète par une mitose suivie d'une division cellulaire (Prescott *et al.*, 2003). Trois mécanismes principaux peuvent être rencontrés (Leyral et Vierling, 2007) :

- Des spores sont produites par transformation des cellules du thalle: thallospores (arthrospores).

Un mycélium arrête sa croissance, les cellules terminales se différencient, se divisent et se séparent. C'est le cas de Trichophyton (spores bourgeonnantes). Chez *Geotrichum*, les spores sont produites par la fragmentation d'un hyphes (spores non bourgeonnantes).

- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour former une cellule particulière, le conidiophore, sur lequel se forment les spores: les conidies

On parle de microconidies pour désigner les conidies constituées d'une seule cellule, de macroconidies pour des spores pluricellulaires.

- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour donner des sporanges dans lesquels se forment des sporangiospores. Ces dernières sont libérées par l'ouverture du sporange parvenu à maturité.

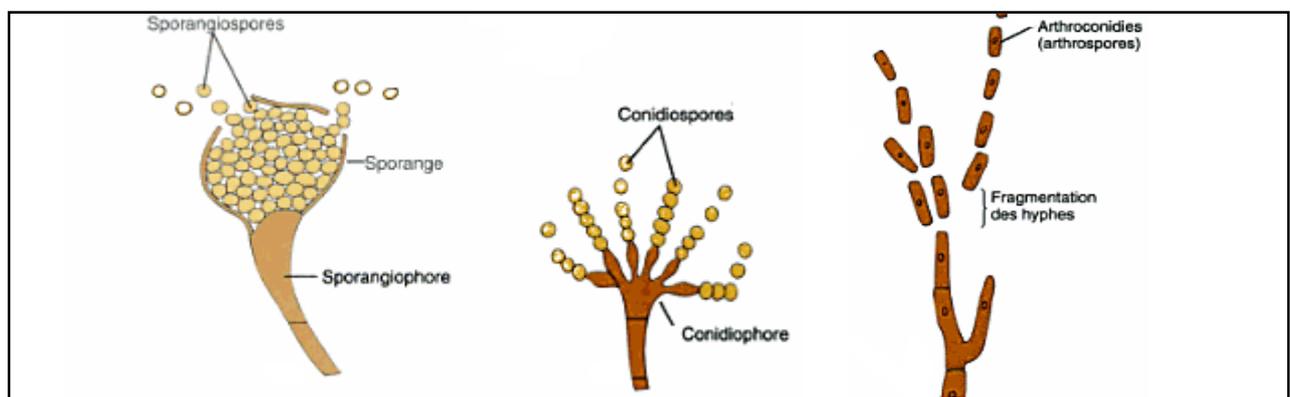


Figure 02. Représentation schématique de quelques types de spores (Prescott *et al.*, 2003).

II.3.2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée chez les mycètes implique l'union de noyaux compatibles (Figure 03). Certaines espèces fongiques sont autofertilisantes et produisent des gamètes sexuellement compatibles sur le même mycélium (homothallie). D'autres espèces requièrent un croisement entre des mycéliums différents mais compatibles sexuellement (hétérothallie). Selon les espèces, la fusion sexuée peut se faire entre des gamètes haploïdes, des corps producteurs de gamètes appelés gamétanges ou des hyphes. Parfois, le cytoplasme et les noyaux haploïdes fusionnent immédiatement pour former le zygote diploïde. Dans la plupart des cas, il y a un décalage entre les fusions cytoplasmiques et nucléaires. Ceci produit un stade dicaryote dans lequel les cellules contiennent deux noyaux haploïdes séparés, un issu de chaque parent. Après une période au stade dicaryote, les deux noyaux fusionnent. La reproduction sexuée produit des spores. Ainsi, chez les zygomycètes, le zygote se transforme en une zygospore; chez les ascomycètes en une ascospore et chez les basidiomycètes en une basidiospore (Prescott *et al.*, 2003). En plus des spores sexuées et asexuées, existent des spores de résistance. Ce sont des cellules déshydratées au métabolisme réduit. Elles sont très résistantes (elles peuvent survivre très longtemps, plusieurs mois, voire plusieurs années). Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables (augmentation de l'humidité principalement), elles germent comme les graines et redonnent du mycélium qui reformera, à son tour des spores (Baudry et Brézellec, 2006).

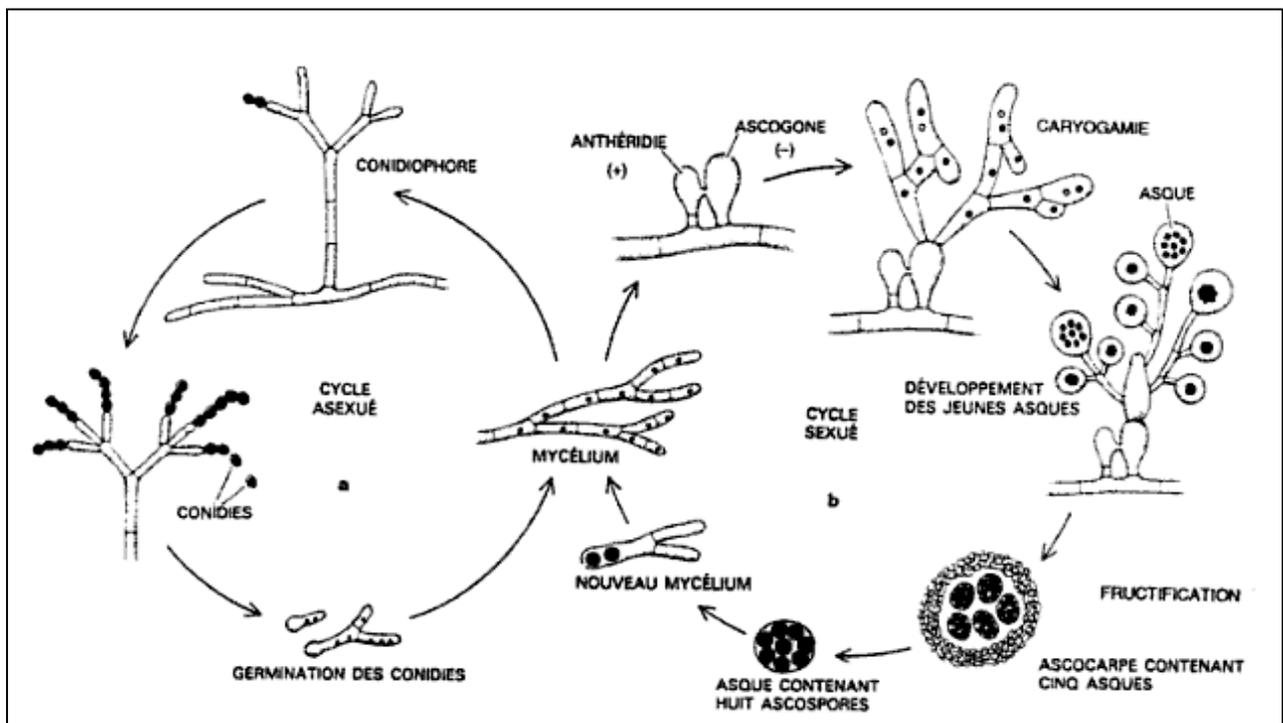


Figure 03. Reproduction des moisissures (Meyer *et al.*, 2004)

II.4. Facteurs influençant le développement des moisissures

Bien qu'elles soient relativement peu exigeantes, un certain nombre de facteurs nutritifs et environnementaux doivent être à leur disposition pour que les moisissures se développent (Roquebert, 1998).

II.4.1. Facteurs nutritifs

Quelque soit leur mode de vie, le développement des moisissures nécessite de l'eau, une source de carbone organique, de l'azote, des sels minéraux sous forme de phosphates, sulfates, nitrates ou à l'état de traces pour le fer, le cuivre, le manganèse et le zinc. Il existe des sources de carbone simples telles que le glucose, que peuvent préférentiellement utiliser tous les champignons. Des sources plus complexes telles que la cellulose, la lignine, les protéines peuvent aussi être dégradées par des enzymes spécifiques de telle ou telle espèce (par exemple les cellulases de *Trichoderma viride*, les ligninases de *Serpula lacrimans*, les protéases de *Scopulariopsis brevicauth*). Les éléments simples qui découlent de cette digestion seront assimilés par le microorganisme. Certains de ces éléments participent directement à la synthèse de matière organique fongique suivant les processus qui constituent le métabolisme primaire, d'autres ne sont pas impliqués dans cette voie et participent au métabolisme dit secondaire, conduisant le plus souvent à des produits de réserve intracellulaires dont on ne connaît pas toujours la fonction mais parmi lesquels se trouvent par exemple des pigments, des antibiotiques et des mycotoxines (Roquebert, 2002).

II.4.2. Facteurs environnementaux

II.4.2.1. Activité d'eau (A_w)

Les spores ne germent pas lorsque la teneur en eau d'un substrat est inférieure à 13 %. Cependant, les exigences et la tolérance vis-à-vis de l'eau sont variables selon les groupes :

- Certaines moisissures ne se développent que sur substrat humide, c'est le cas, par exemple, des *Mucorales* ;
- D'autres peuvent proliférer sur des substrats dont l'humidité est très faible. Ce sont les moisissures xérophiles qui rassemblent les espèces les plus osmophiles. Parmi ces espèces, les mieux adaptées aux substrats secs sont les *Aspergillus*. Ce sont eux qui, les premiers, colonisent les stocks de grains en silo, préparant le terrain pour d'autres espèces (Leyral et Vierling, 2007).

II.4.2.2. Température

La plupart des moisissures sont mésophiles, c'est à dire qu'elles se développent autour de 20°C. Cependant, certaines espèces peuvent proliférer à des températures plus élevées ou plus basses (Roquebert, 1998). A très basse température, les moisissures ne sont pas tuées, leurs spores survivent et resteront aptes à germer lors de leur retour à des conditions normales (Moreau, 1996).

II.4.2.3. Oxygène et gaz carbonique

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies ; les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats ; les moins exigeantes peuvent se développer en profondeur (Bourgeois, 1996). C'est pour cela, l'oxygène est nécessaire pour leur développement ; elles peuvent s'adapter à une atmosphère confinée (plus riche en gaz carbonique que l'oxygène), c'est le cas d'*Aspergillus elavaus*. Dans l'ensemble, un accroissement de la teneur en gaz carbonique du milieu diminue et supprime la croissance des moisissures (Derache, 1986).

II.4.2.4. pH

Les moisissures sont extrêmement tolérantes aux variations de pH (2 à 9) avec un optimum de croissance pour un pH de 4 à 6,5. De plus, les moisissures peuvent adapter localement leur pH pour qu'il soit optimum (Chene, 2006). Certaines *Penicillium* peuvent encore croître à pH très bas (pH = 1) (Leyral et Vierling, 2007).

III.1. Définition

Les polyphénols sont des constituants naturels présents dans les aliments d'origine végétale, comme les céréales, les fruits, les légumes et les boissons (thé, café et vin). Ce sont des métabolites secondaires que les plantes produisent pour se protéger contre d'autres organismes (Luthar, 1992; Tsao, 2010). Ils sont caractérisés par une structure en polyphénols, ce qui signifie qu'ils ont plusieurs groupes hydroxyles sur deux ou plus six atomes de carbone des cycles aromatiques (D'Archivio *et al.*, 2007; Stevenson et Hurst, 2007; Weichselbaum et Buttriss, 2010). Les molécules avec un seul cycle telles que les acides phénoliques et les alcools phénoliques ne sont pas proprement des polyphénols mais elles partagent plusieurs de leurs propriétés et caractéristiques (Stevenson et Hurst, 2007) et sont généralement incluses avec les polyphénols (Weichselbaum et Buttriss, 2010).

III.2. Classification

Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (Tsao, 2010). Les structures des composés phénoliques s'étendent sur des molécules simples telles que les acides phénoliques aux composés fortement polymérisés comme les proanthocyanidines (Mursu, 2007).

Selon Han *et al.* (2007), les composés phénoliques sont subdivisés en groupes selon le nombre de noyaux phénoliques et les éléments structurels qui relient ces cycles : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les tanins, les lignanes et les lignines polymères.

III.2.1. Acides phénoliques

Le nom « acides phénoliques », en général, décrit les phénols qui possèdent une fonctionnalité d'acide carboxylique. Cependant, lors de la description des métabolites de la plante, il se réfère à un groupe distinct d'acides organiques (Robbins, 2003). Les acides phénoliques sont des dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (Han *et al.*, 2007 ; Tsao, 2010) et sont présents dans toutes les céréales (Dykes et Rooney, 2007).

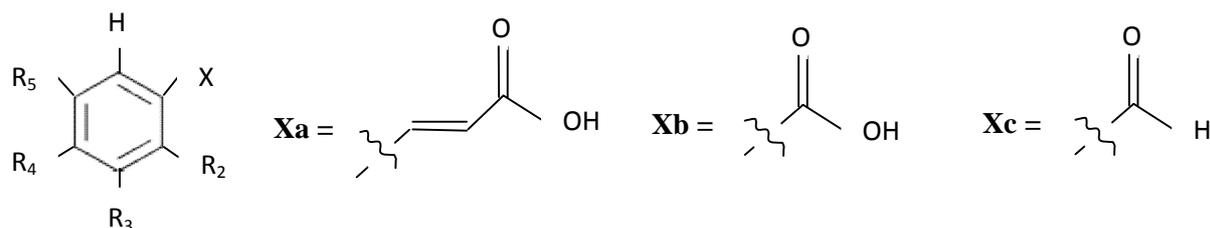
Ces acides phénoliques naturels contiennent deux structures distinctes de carbone : les structures hydroxycinnamiques (Xa) et hydroxybenzoïques (Xb) (Tableau 01). Bien que le squelette de base reste le même, le nombre et la position des groupes hydroxyles sur le noyau aromatique créent la différence. Dans de nombreux cas, les analogues de l'aldéhyde (Xc) sont également regroupés avec, et dénommés, les acides phénoliques (par exemple, la vanilline) (Robbins, 2003). L'acide férulique (Figure 03-A), l'acide p-coumarique (Figure 04-B), l'acide

vanillique, l'acide caféique et l'acide protocatéchique sont des acides présents dans presque toutes les plantes (Shahidi *et al.*, 1992). D'autres acides phénoliques (gentisique, syringique) se trouvent dans certains aliments ou des plantes (Robbins, 2003).

Tableau 01. Structures de l'éminent naturel des acides phénoliques (Robbins, 2003).

| R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | X | code | nom commun |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|------|----------------------------|
| H | H | H | H | a | 1 | l'acide cinnamique |
| -OH | H | H | H | a | 2 | l'acide o-coumarique |
| H | H | -OH | H | a | 3 | l'acide p-coumarique |
| H | -OH | H | H | a | 4 | acide m-coumarique |
| H | -OCH ₃ | -OH | H | a | 5 | acide férulique |
| H | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | a | 6 | acide sinapique |
| H | -OH | -OH | H | a | 7 | l'acide caféique |
| H | H | H | H | b | 8 | l'acide benzoïque |
| -OH | H | H | H | b | 9 | l'acide salicylique |
| H | H | -OH | H | b | 10 | l'acide p-hydroxybenzoïque |
| H | -OCH ₃ | -OH | H | b | 11 | acide vanillique |
| H | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | b | 12 | acide syringique |
| H | -OH | -OH | H | b | 13 | acide protocatéchique |
| -OH | H | H | -OH | b | 14 | acide gentisique |
| -OH | -OH | -OH | -OH | b | 15 | acide gallique |
| H | -OCH ₃ | -OCH ₃ | H | b | 16 | acide vératrique |
| H | -OCH ₃ | -OH | -OCH ₃ | c | 17 | syringaldehyde |
| H | -OCH ₃ | -OH | H | c | 18 | vanilline |

Sachant que :



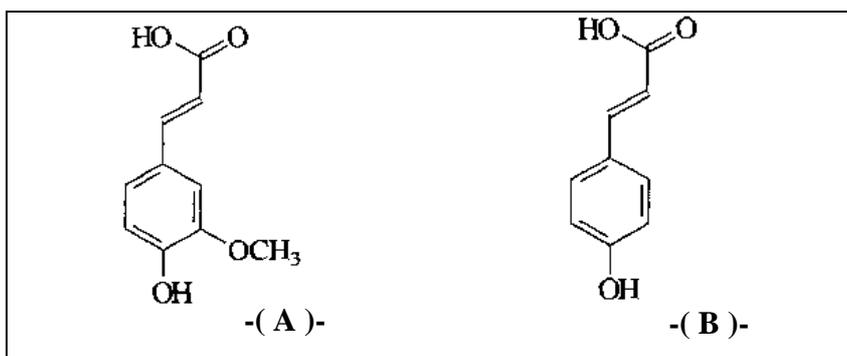


Figure 04. Structures chimiques de : (A) l'acide férulique,
(B) l'acide ρ -coumarique (Ralphe et Helm, 1993).

III.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe des composés phénoliques des plantes (Balasundram *et al.*, 2006). Ils peuvent être reconnus comme pigments responsables de la couleur des feuilles surtout en automne (Atanasova et Ribarova, 2009) et la couleur des autres parties de plantes comme les fruits et les fleurs (Stevanovic *et al.*, 2009).

Les flavonoïdes présentent un squelette carboné commun en C6-C3-C6 (Stevanovic *et al.*, 2009). Essentiellement, la structure se compose de deux cycles aromatiques A et B, reliées par un pont 3-carbone, habituellement sous la forme d'un hétérocycle C (figure 05). Les substitutions des cycles A et B donnent lieu à des différents composés au sein de chaque classe des flavonoïdes (Pietta, 2000). Ces substitutions peuvent inclure l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation, et de la sulfatation (Balasundram *et al.*, 2006). Les flavonoïdes sont divisées en 6 sous-classes selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C : flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, anthocyanidines et flavanols (également appelés flavan-3-ols ou catéchines) (Annexe I) (Scalbert et Williamson, 2000).

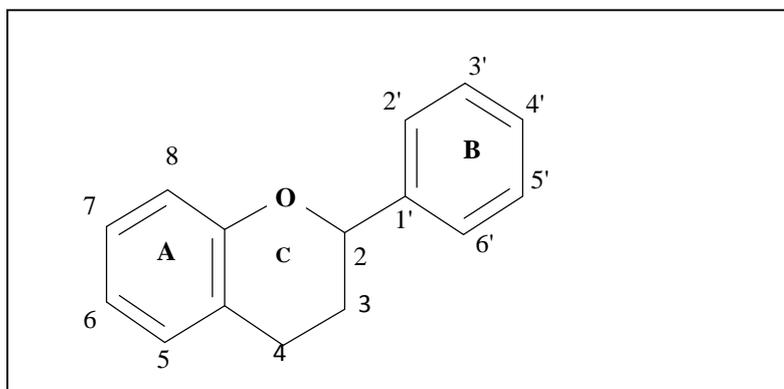


Figure 05. Structure générique d'une molécule de flavonoïdes (Balasundram *et al.*, 2006).

III.2.3. Tanins

Les tanins constituent un groupe complexe des polymères d'origine naturelle (Bennick, 2002), ce sont des composés relativement de haut poids moléculaire qui constituent le troisième groupe important de composés phénoliques et qui peuvent être subdivisées en tanins hydrolysables et condensés (Annexe I). Les premiers sont des esters d'acide gallique (gallo-et-ellagi tanins), tandis que les derniers polymères (également connus sous le nom de proanthocyanidines) sont des monomères polyhydroxyflavan-3-ol. Une troisième subdivision, les phlorotannins, entièrement composés de phloroglucinol, ont été isolés chez plusieurs genres d'algues brunes, mais ce ne sont pas significatifs dans l'alimentation humaine (Balasundram *et al.*, 2006).

III.2.4. Stilbènes

Les Stilbènes sont structurellement caractérisées par la présence d'un noyau 1,2-diphényl avec hydroxyles substitués sur les cycles aromatiques, et existent sous la forme de monomères ou oligomères (Han *et al.* 2007). Les Stilbènes existent sous forme stéréoisomères de formes E (cis) et Z (trans), selon l'endroit où les groupes fonctionnels sont inscrits par rapport à l'autre des deux côtés de la double liaison (Annexe I). Les Stilbènes d'origine naturelle existent dans la grande majorité sous forme Z (Roupe *et al.*, 2006).

III.2.5. Lignanes

Les lignanes sont formés de 2 unités phénylpropane (Annexe I) (Manach *et al.*, 2004), pour la plupart ils sont présents dans la nature sous forme libre tandis que leurs dérivés glycosidiques ne sont qu'une forme mineure (D'Archivio *et al.*, 2007).

III.2.6. Lignines polymères

La lignine "à partir du mot latin *lignum*" signifie le bois (Moura *et al.*, 2010). Les lignines sont des polymères aromatiques méthoxylés des phénylpropanoïdes reliés par à la fois des liaisons éther et carbone-carbone (Annexe I) (Ralph *et al.*, 2004). Les lignines sont des polymères produits naturels à partir de trois principaux précurseurs (alcools *p*-coumarylique, coniférylique, et sinapylique) résultant d'une polymérisation catalysée par l'enzyme déshydrogénant (Bunzel *et al.*, 2004).

III.3. Propriétés biologiques des polyphénols

III.3.1. Activité anti-oxydante

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation (D'Archivio *et al.*, 2007), ils possèdent encore plus de potentiel antioxydant *in vitro* que les vitamines et les caroténoïdes (Weichselbaum et Buttriss, 2010). Les grains de blé sont considérés comme des sources particulièrement riches en acides phénoliques, qui sont situés dans la couche de son. Le son de blé dur a démontré une activité antioxydante dans un modèle *in vitro*. L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, des donateurs d'hydrogène et des extincteurs d'oxygène (Kahkonen *et al.*, 1999).

Les acides phénoliques et leurs esters ont une activité antioxydante qui dépend du nombre de groupes hydroxyles dans la molécule. Les propriétés électro-attractrices du groupe carboxylate, qui ont une influence négative sur les capacités H-donnant de hydroxybenzoates, peuvent être évitées par l'encombrement stérique (Stern *et al.* 1996).

Les acides benzoïques monohydroxy agissent comme des antioxydants très faibles, en raison du potentiel électronégatif d'un seul groupe carboxyle ; seul l'acide m-hydroxybenzoïque a une activité antioxydante élevée. L'activité antioxydante totale des acides hydroxycinnamiques est plus élevée que celle des acides hydroxybenzoïques. Cette activité peut être augmentée par certaines substitutions des méthoxylation, mais la glycosylation du groupe carboxylate n'a aucune influence sur cette propriété (Rice-Evans *et al.*, 1996). La plus grande activité de l'acide hydroxycinnamique pourrait être due au groupement $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, ce qui assure une plus grande capacité de H-donnant et la stabilisation radicale du groupe $-\text{COOH}$ dans les acides hydroxybenzoïques (Balasundram *et al.*, 2006).

Il existe des nombreux rapports sur l'activité anti-radicalaire, l'activité oxydase inhibitrice de l'acide férulique et de ses dérivés dans les données de la littérature. L'acide férulique et ses dérivés sont également responsables des propriétés antioxydantes des grains de céréales (Karamać *et al.*, 2007).

La recherche a révélé que la forme Z des composés Stilbènes présente une activité plus puissante par rapport à la forme E dans divers tests antioxydants (Roupe *et al.*, 2006).

Des réactions biochimiques et chimiques impliquent les polyphénols au cours du stockage et dans la transformation des aliments. Le processus biochimique le plus important est l'oxydation enzymatique, qui commence dès que l'intégrité de la cellule est brisée, mais d'autres types d'enzymes, telles que les estérases, les glycosidases, et décarboxylases, peuvent aussi servir de catalyseurs des transformations et des dégradations de composés polyphénoliques. Les réactions chimiques, ont lieu progressivement, sont répandues quand les activités enzymatiques diminuent (Cheynier, 2005).

En plus de piéger les radicaux, les polyphénols sont également connus comme chélateurs de métaux. Chélation de métaux de transition tels que Fe^{2+} qui peut directement réduire le taux de réaction de Fenton, empêchant ainsi l'oxydation provoquée par des radicaux hydroxyles très réactifs. Les polyphénols n'agissent pas seuls ; il a été constaté qu'ils peuvent effectivement fonctionner comme un co-antioxydant, et sont impliqués dans la régénération des vitamines essentielles (Tsao, 2010).

III.3.2. Activité antibactérienne et antifongique

Les plantes synthétisent rapidement des substances de défense contre les attaques par les micro-organismes (Masibo et He, 2009). Elles ont plusieurs lignes de défense contre l'invasion d'agents pathogènes y compris les barrières préformées et les réponses induites. Les traductions ultérieures incluent une production rapide des dérivés d'oxygène et la synthèse de composés phénoliques (Guleria et Kumar, 2006).

Les composés antimicrobiens préformés tels que les composés phénoliques et polyphénoliques sont omniprésents dans les plantes et jouent un rôle important dans la résistance non-hôte de champignons filamenteux. Le terme « phytoanticipines » a été proposé pour distinguer ces composés antifongiques préformés des « phytoalexines » qui sont synthétisées à partir de précurseurs à distance en réponse à une attaque de pathogènes.

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme des plantes. Ils protègent aussi la plante contre les agressions (Dicko *et al.*, 2006).

Les polyphénols sont des composés très susceptibles d'auto-oxydation en présence de l'oxygène de l'air. Cette oxydation se traduit par une polymérisation des monomères tels les monomères de flavonoïdes pour donner des polymères de poids moléculaires élevés. Il a été démontré que le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes se fait soit par la privation

des ions métalliques tels que le fer, soit par des interactions non spécifiques tel que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines). Cependant un important facteur qui régit l'activité antimicrobienne des polyphénols est leur poids moléculaire, les monomères sont trop petits pour établir assez des ponts d'hydrogène tandis que les polymères de haut poids moléculaire sont trop grands pour traverser la paroi bactérienne, le poids moléculaire idéal serait donc celui des oligomères (Karou *et al.*, 2005).

III.3.2.1. Activité antibactérienne

Selon Raj *et al.* (2001), Parmi 182 études sur les flavonoïdes, vingt-cinq ont trouvé une activité contre de nombreuses bactéries. De nombreuses préparations phytochimiques en teneur élevée en flavonoïdes ont également présenté une activité antibactérienne : exemples de ces flavonoïdes sont l'apigénine, la quercétine, 3-O -methylquercetin, différents glycosides, le kaempférol et de ses dérivés. Autres flavones (les flavones glycosides, les isoflavones, les flavanones, les isoflavanones, les isoflavans, les flavonols, les flavonols glycosides) ont démontré une activité antibactérienne (Cushnie et Lamb, 2005). L'une des actions moléculaires des tanins est la complexité avec des protéines par les forces dites non-spécifiques telles que les liaisons hydrogènes et les effets hydrophobes, ainsi que par la formation de liaisons covalentes (Stern *et al.*, 1996).

III.3.2.2. Activité antifongique

Certains composés phénoliques antibiotiques sont stockés dans les cellules des plantes comme des formes liées inactives, mais sont facilement convertis dans la plante en antibiotique biologiquement active par hydrolyse enzymatique (glycosidases) en réponse à une attaque pathogène. Ces composés peuvent également être considérés comme des composés antimicrobiens préformés depuis les enzymes de la plante qui activent entre eux. Ils sont déjà présents, mais sont séparés de leurs substrats par le compartimentage, permettant l'activation rapide sans exigence pour la transcription des nouveaux produits géniques. Dans de tels cas, les composés phénoliques libres sont susceptibles d'être beaucoup plus toxiques pour l'organisme envahisseur que les formes liées. En outre, même si les composés phénoliques préformés antifongiques sont présents dans les plantes en bonne santé à des niveaux qui devraient être antimicrobiens, leurs niveaux pourraient encore augmenter, en réponse au défi par des agents pathogènes (Lattanzio *et al.*, 2006).

La lignification a le potentiel d'agir de plusieurs manières dans la défense des plantes contre les infections pathogènes. Elle peut établir des barrières mécaniques à l'invasion des pathogènes, de modifier chimiquement les parois cellulaires pour être plus résistantes contre les enzymes dégradant la paroi cellulaire, augmenter la résistance des parois à la diffusion des toxines de l'agent pathogène à l'hôte et des nutriments provenant de l'hôte au pathogène, produire des précurseurs toxiques. La lignification rend la paroi cellulaire plus résistante à la pression mécanique appliquée lors de la pénétration des champignons *Appressoria* et plus résistante à l'eau et donc moins accessible aux enzymes dégradant la paroi cellulaire. En plus du rôle de la lignine comme un facteur de résistance préformé, l'induction de la lignification a été proposée comme un mécanisme de résistance active des plantes aux champignons (Bhuiyan *et al.*, 2009).

Différents types de composés phénoliques, tels que l'acide férulique, l'acide gallique ou les flavonoïdes ont été prouvés soit pour stimuler ou inhiber la germination des spores et la croissance des hyphes des champignons saprotrophes. Les champignons mycorhizes peuvent être encore plus sensibles aux composés phénoliques, mais encore une fois les différents types de polyphénols peuvent avoir des effets opposés. Par exemple, la biomasse d'un mycélium des mycorhizes éricoïdes a été réduite par un mélange des acides phénoliques communs. (Hättenschwiler et Vitousek, 2000). Les flavonoïdes (chryisine, isorhamnétine, kaempférol et lutéoline) ont un effet sur la croissance des champignons pré-symbiotiques (champignons mycorhiziens arbusculaires) notamment sur la germination des spores, la longueur des hyphes, la ramification des hyphes, la formation de cellules secondaires auxiliaires et les spores (*Gigaspora rosea*, *G. margarita*, *Glomus mosseae* et *G. intraradices*) (Scervino *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes et les esters d'acides phénoliques ont été étudiés pour leur activité antifongique (Raj *et al.*, 2001), ils ont démontré une activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (Cushnie et Lamb, 2005). La propriété lipophile et/ou la présence au moins d'un groupe acide d'hydroxyle sont donc considérés comme un dispositif structural essentiel pour une bonne activité antifongique. La propriété lipophile permet aux phénols actifs de pénétrer à travers les membranes biologiques tandis que les groupes d'hydroxyle peuvent agir par l'inhibition de la phosphorylation oxydative (Tomás-Barberán *et al.*, 1990).

Selon Karamać *et al.* (2007), l'acide férulique et ses dérivés présentent une activité antimicrobienne. L'acide salicylique (SA) est un moyen de défense chimique inducteur de la résistance aux maladies fongiques et les réponses hypersensibles à de nombreuses espèces

végétales (Kusumoto *et al.*, 2007). Les proanthocyanidines dans les téguments des blés d'hiver peuvent avoir une importance particulière en tant qu'agents de protection car ils sont résistants à la dégradation microbienne et leur présence peut conférer une certaine protection des grains contre les micro-organismes du sol aux zones d'hivernage (Mccallum et Walker, 1990). Les lignanes jouent également un rôle dans les interactions plante-champignon. Certaines activités fongistatiques des lignanes sont attribuables à l'inhibition des enzymes extracellulaires fongiques (cellulase, polygalacturonase, glucosidase et laccase) (Macrae et Towers, 1984).

La toxicité des tanins, tanins hydrolysables et proanthocyanidins, habituellement estimés par la mesure de la réduction de la croissance *in vitro* du mycélium, est bien documentée pour plusieurs mycètes filamenteux, par exemple *Aspergillus niger*, *Colletotrichum graminicola*, *Gloeophyllum trabeum*, *Trichoderma viride* et *Penicillium sp.*, etc. Les tanins et les composés phénoliques liés empêchent les hydrolases extracellulaires des microbes pathogènes envahissants, de ce fait empêchent leur développement rapide sur la plante. Ils inhibent les enzymes fongiques extracellulaires (cellulase, pectinase, laccase, xylanase, etc.), ils diminuent les substrats nutritifs (complexation avec métaux, insolubilisation des protéines) et sont efficacement impliquées par leur toxicité sur les membranes fongiques (inhibition de la phosphorylation oxydative) (Lattanzio *et al.*, 2006).

III.4. Formes d'existence des composés phénoliques *in vivo*

III.4.1. Complexation polyphénols- polysaccharides

Parmi les polyphénols du grain de blé, figure l'acide férulique. Ce dernier se trouve principalement sous la forme *trans*, est estérifié avec l'arabinoxylane (Manach *et al.*, 2004), l'hémicellulose (Scalbert et Williamson, 2000), le stanol, le stérol et le glucose. Les principaux composés de stéryl férulate présents dans le grain de blé sont le campestanyle et le férulate sitostanyle (Naczki et Shahidi, 2006).

L'acide férulique (FA) et l'acide *p*-coumarique (*p*-CA) sont reliés par des liaisons ester avec l'arabinose (Ara) et le xylose (Xyl) respectivement comme suite : FA-Ara-(Xyl)₂ et *p*-CA-Ara-(Xyl)₂ (Figure 05 –A- et –B-). L'acide férulique est relié par des liaisons ester avec le xylose (Xyl) et le glucose (Glc) comme suite : FA-Xyl- Glc (Figure 05 – C-) (Ralph et Helm, 1993). Les acides phénoliques présents dans la paroi cellulaire sont supposés jouer un rôle important dans la réticulation des polysaccharides avec des composants de la paroi cellulaire, y compris la lignine par des liaisons ester et d'éther (Figure 06) (Parker *et al.*, 2005).

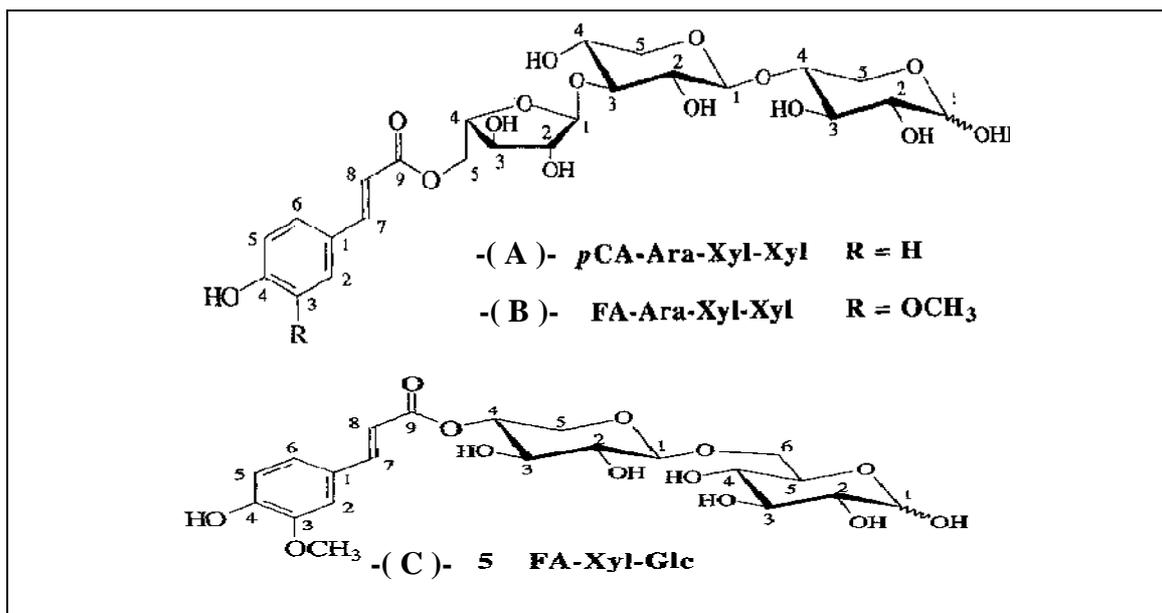


Figure 06. Structures chimiques de l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique reliés avec l'arabinose (Ara), le xylose (Xyl) et le glucose (Glc) par des liaisons ester (Ralph et Helm, 1993).

4.2. Complexation polyphénols- polyphénols

Une caractéristique qui distingue la lignine chez les plantes est la présence, intimement associés à des composants des parois cellulaires, des acides hydroxycinnamiques (acide *p*-coumarique, l'acide férulique, et l'acide sinapique). Ces trois acides sont les précurseurs de l'alcool *p*-coumarylique 2a, de l'alcool coniférylique et de l'alcool sinapylique qui sont formés des lignines par déshydrogénation polymérisées (Ralph et Helm, 1993). Les couplages croisés des structures de l'alcool férulate 4-O-β et 8-β-coniférylique indiquent le couplage croisé des radicaux des polysaccharides à des précurseurs de la lignine par l'intermédiaire de férulate (Bunzel *et al.*, 2004); bien que les constituants des acides diferulique, sinapique, cinnamique, et *p*-hydroxybenzoïque peuvent également être trouvés (figure 07). Chacun de ces "acides cinnamiques" sont mentionnés comme tels parce qu'ils ont été dérivés de l'acide trans-cinnamique dans le métabolisme des phénylpropanoïdes, et sont particulièrement engagés entre l'hémicellulose et la lignine de base dans la matrice de la paroi des cellules végétales (Bidlack *et al.*, 1992).

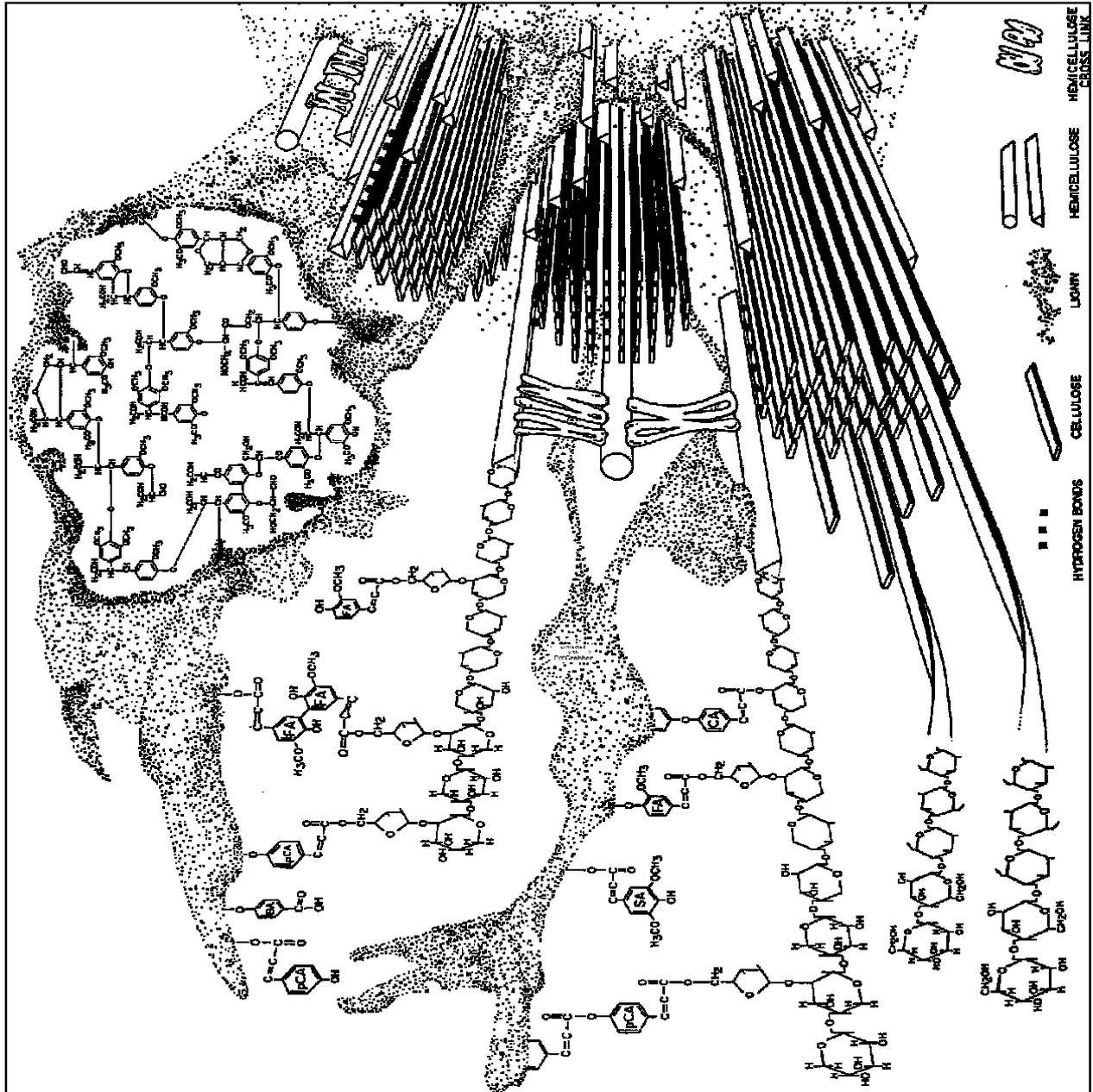


Figure 07. Structure secondaire de la paroi cellulaire : couplage croisé des radicaux des polysaccharides à précurseurs de la lignine par l'intermédiaire des acides : férulique (AF), *p*-coumarique (APC), *p*-hydroxybenzoïque (BA), sinapique (SA), et cinnamique (CA) (Bidlack *et al.*, 1992).

4.3. Complexation polyphénols- protéines

Le complexe protéines-polyphénols (PPC) se forme soit pendant la sénescence des tissus de la plante, quand les polyphénols stockés dans la vacuole entrent en contact avec des protéines cytoplasmiques, ou provient du sol, quand les polyphénols se complexent avec des protéines provenant de la litière et/ou avec des enzymes extracellulaires à partir de microorganismes. La formation de complexe protéines-polyphénols provoque la coloration brune des feuilles

sénescentes. Le complexe PPC peut représenter plus de 20% de la masse sèche de la feuille. Le complexe protéines-polyphénols est résistant à la dégradation de la plupart des microorganismes, sauf les basidiomycètes qui ont des activités appropriées grâce à leur enzyme (polyphénol oxydase) (Hättenschwiler et Vitousek, 2000).

5. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols

La teneur en polyphénols dans les aliments peut varier en fonction des facteurs : génétiques, environnementaux et technologiques. Certains d'entre eux pourraient être contrôlés afin d'optimiser la teneur en polyphénols des aliments (Kondakova *et al.*, 2009).

5.1. Effet variétal

La teneur en composés phénoliques varie significativement entre les variétés de blé (Beta, 2005). La teneur en polyphénols dans les plantes est principalement déterminée par des facteurs génétiques (Mursu, 2007). La concentration de composés phénoliques est généralement plus élevée dans les génotypes des plantes cultivées résistants aux maladies que chez les génotypes sensibles. Des études ont également montré que les changements qualitatifs et quantitatifs de ces composés se produisent après une infection (Luthra *et al.*, 1988).

Selon Benbrook (2005), le contenu en composés phénoliques totaux de onze variétés de blé a été étudié, il a constaté une différence significative variétale en particulier pour la teneur en acide férulique.

5.2. Effet de la transformation technologique

La transformation industrielle des aliments influe également sur la teneur en polyphénols. Le décorticage des graines de légumineuses et le boullonnage des céréales peuvent entraîner une perte de certains polyphénols. Le broyage des tissus végétaux peut conduire à la dégradation par oxydation des polyphénols à la suite de décompartmentation cellulaire et le contact entre le polyphénol oxydase cytoplasmique et les substrats phénoliques présents dans les vacuoles. Les polyphénols sont ensuite transformés en pigments bruns qui sont polymérisés à des degrés divers (Manach *et al.*, 2004).

Comme indiqué précédemment, la localisation des composants dans les matières végétales devient importante lorsque les tissus, comme les pelures et les téguments sont séparés des autres composants au cours du traitement. Cela peut réduire le niveau de composés

antioxydants (composés phénoliques) des certains produits alimentaires transformés, alors que le rendement des sous-produits de transformation contiennent encore des taux substantiels des composés phénoliques (Kalt, 2005), comme par exemple le son de blé est riche en acide férulique (5 mg / g) (Scalbert et Williamson, 2000), ce qui signifie que la teneur en acide férulique de la farine de blé est donc directement liée à des niveaux de tamisage (Manach *et al.*, 2004).

5.3. Conditions de culture

5.3.1. Lumière du soleil

En raison de la lumière du soleil, les plus fortes concentrations de composés phénoliques sont habituellement trouvées soit dans les feuilles des plantes ou dans la peau des fruits tandis que des quantités mineures se trouvent dans les parties intérieures. La biosynthèse des polyphénols est stimulée par la lumière du soleil et donc les climats ensoleillés habituellement augmentent les concentrations des polyphénols (Mursu, 2007).

5.3.2. Température

Le stress imposé par la température a des conséquences importantes pour l'agriculture (Lewitt, 1980). D'une part, Une conséquence bien connue de températures élevées dans les plantes est le dommage oxydative causée par un déséquilibre thermique induit par la photosynthèse et la respiration. La limitation de la photosynthèse peut augmenter le taux de formation d'oxygène actif dans les chloroplastes ou d'entraver l'activité de défense antioxydante. Des formes actives d'oxygène (par exemple, O_2^-) attaquent une variété de composants cellulaires, elles provoquent la peroxydation des lipides et par conséquent des blessures membranaires, la dégradation des protéines, l'inactivation des enzymes ; la décoloration des pigments et la perturbation des brins d'ADN. Le mécanisme de défense antioxydant est une partie de l'adaptation au stress de chaleur et sa force est en corrélation avec l'acquisition de la thermotolérance. Il est prouvé que l'effet antioxydant est principalement dû à des composés phénoliques. Les composés phénoliques sont souvent régulés à la hausse en réponse aux stress épisodes. Certains d'entre eux ont un rôle de protection en raison de leurs propriétés antioxydantes et sont fortement corrélés avec la capacité de piégeage des radicaux libres (Mohammad *et al.*, 2007).

D'autre part, les plantes ont des résistances différentes à la température de réfrigération et de congélation. La tolérance au gel est due à la capacité d'éviter la formation de glace intracellulaire et de résister à la formation de glace extracellulaire. Les plantes produisent

plusieurs composés pour que les cellules se protègent contre la formation de glace intracellulaire et intercellulaire. L'acide salicylique, synthétisé de façon endogène, joue un rôle essentiel dans la thermogénèse et dans l'activation de certaines réponses de défense des plantes, y compris l'expression des gènes liées à la pathogénèse. Seules quelques études récentes ont rapporté les effets de l'acide salicylique sur les dommages par le gel. Ces résultats montrent que l'acide salicylique peut augmenter la tolérance au gel chez le blé d'hiver (Taşgın *et al.*, 2003).

5.3. Stress hydrique

Les tissus végétatifs de la plupart des plantes sont sensibles au déficit hydrique et ne peuvent pas persister dans les périodes de faible disponibilité en eau (Farrant *et al.*, 2009). Plusieurs variétés et génotypes d'espèces cultivées de blé sont capables de montrer des degrés variables de tolérance à la sécheresse dans les tissus des végétaux à travers l'évolution des mécanismes tels que l'efficacité de meilleure utilisation de l'eau et/ou l'ajustement osmotique qui décline les dommages associés à la perte d'eau (Moore *et al.*, 2008).

Parmi les mécanismes de protection prétendue, le contrôle de la perte de la chlorophylle et le démantèlement des membranes thylacoïdes (poikilochlorophyllous) ou de rétention. Le masquage de la chlorophylle (homoiochlorophyllous) contre la lumière afin de minimiser la production d'espèce d'oxygène réactif (ROS) lors de la photosynthèse ; l'accumulation et la régulation positive des antioxydants pour abaisser les ROS formés (Farrant *et al.*, 2009).

Durant des périodes de sécheresse prolongées, des travaux ont montré une accumulation des composés phénoliques et des lignines dans les racines des plantes. Il est très probable que ces composés phénoliques et des monomères de lignine ont de liaisons covalentes croisées aux polysaccharides de la paroi à travers les peroxydases et les enzymes oxydases. Ces liaisons transversales des phénoliques renforcent la structure de la paroi tandis que la formation de lignine est accompagnée d'élimination de l'eau de la paroi. Concomitante avec la production de composés phénoliques, il a été démontré que la transcription des enzymes de biosynthèse de la lignine augmente avec le stress hydrique dans la zone d'élongation en les préparant pour la lignification. Ces actions provoquent la paroi pour devenir de plus en plus inflexible et rigide (Moore *et al.*, 2008).

5.4. Effet de stockage

L'entreposage peut également influencer sur le contenu des polyphénols qui sont facilement oxydés. Les réactions d'oxydation conduisent à la formation de substances plus ou moins

polymérisées qui conduisent à des changements dans la qualité des aliments, en particulier dans la couleur et les caractéristiques organoleptiques (Kondakova *et al.*, 2009). Les résultats de stockage de la farine de blé marquent une perte d'acides phénoliques. Après 6 mois de stockage, les farines contenant les mêmes acides phénoliques, en termes qualitatifs, mais leurs concentrations sont moins de 70% (Manach *et al.*, 2004).

6. Composés polyphénoliques du grain de blé dur

6.1. Nature et teneur

Plusieurs acides phénoliques sont présents dans le grain de blé (Tableau 03). Il s'agit en particulier des acides hydroxycinnamiques : l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide cinnamique ; des acides hydroxybenzoïques : l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechique, l'acide syringique, l'acide salicylique et l'acide vanillique ; des flavonoïdes : glycoside apigénine, tricine, cyanidine 3-galactoside, cyanidine 3-glucoside, delphinidine 3-glucoside, delphinidine 3-rutinoside, pétunidine 3-glucoside et pétunidine 3 – rutinoside, et alkylresorcinols (Dayks et Rooney, 2007). Les taux en catéchine et en tanins (di-, tri-, et oligomères des proanthocyanidines) sont de l'ordre de 20-40 µg/g du poids frais de son. Les oligomères proanthocyanidines contiennent principalement la prodelphinidine et certaines unités de procyanidine, alors que les dimères proanthocyanidines peuvent également contenir certaines unités propelargonidin, Procyanidin B3 (catéchine-[4 → 8]-catéchine) et B3 prodelphinidine (gallocatéchine -[4 → 8] - catéchine) (Mccallum et Walker, 1990).

Tableau 02. Nature et teneur des composés phénolique dans le grain de blé

| Composés phénoliques | Teneur dans le grain | Référence bibliographique |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| acide férulique | 0,8 - 2 g / kg du poids sec | Manach <i>et al.</i> , 2004 |
| acide sinapique | 73 µg /g de son | Boutigny <i>et al.</i> , 2010 |
| acide p-coumarique | 34 µg/g de son | Boutigny <i>et al.</i> , 2010 |
| acide vanillique | 13µg/ g de son | Boutigny <i>et al.</i> , 2010 |
| acide p-hydroxybenzoïque | 7 µg /g de son | Boutigny <i>et al.</i> , 2010 |
| acide caféique | 12.26 ± 2.41 µg/g de grain | Mpofu <i>et al.</i> , 2006 |
| acide syringique | 13.18 ± 3.03 µg/g de grain | Mpofu <i>et al.</i> , 2006 |
| lignine | 0.6-1.3 g/100 g de grain | Čukelj <i>et al.</i> , 2010 |
| lignane | 490 mg/100 g de grain | Čukelj <i>et al.</i> , 2010 |
| alkylresorcinols | 489-1429 µg/g de grain | Ross <i>et al.</i> , 2003 |

6.2. Compartimentage ou localisation dans la plante

La distribution des phénols dans les plantes, les tissus et les cellules n'est pas uniforme (Atanasova et Ribarova, 2009). La distribution des composés phénoliques préformés antifongiques dans les plantes est souvent spécifique du tissu et il y a une tendance pour de nombreux composés lipophiles (flavone par exemple les éthers de méthyle et les flavonols) qui sont situés à la surface de la plante (par exemple dans la cire des feuilles et bourgeons exsudats) ou dans la fraction cytoplasmique dans les cellules de l'épiderme, ce qui suggère qu'ils peuvent en effet agir comme moyen de dissuasion contre les agents pathogènes. En général, les composés phénoliques préformés antifongiques sont souvent séquestrés sous forme conjuguée, le plus souvent avec des liaisons glycosidiques, dans les vacuoles ou les organites de plantes saines. Les biotrophes peuvent éviter le rejet d'antibiotiques préformés en minimisant la dommage à l'hôte, alors que les nécrotrophes sont susceptibles de causer un important dégagement de ces composés (Lattanzio *et al.*, 2006).

Les acides hydroxycinnamiques sont constitutifs de polymères de la paroi cellulaire des plantes telles que la lignine, la subérine et la cutine. Ces polymères sont des barrières physiques contre les prédateurs d'invasion, la sécheresse et de plusieurs autres facteurs du stress (Dicko *et al.*, 2006).

6.3. Compartimentage ou localisation dans le grain

Les parois des cellules de l'épiderme et l'hypoderme de blé ont une grande quantité et un haut degré de polymérisation des constituants aromatiques par rapport à celles des autres cellules (Akin, 1995).

L'acide férulique se localise principalement dans les parties externes du grain. La couche à aleurone et le péricarpe du grain de blé contiennent 98% de l'acide férulique total (Manach *et al.*, 2004). La composition en acides phénoliques de la couche péricarpe de blé tendre contient plus d'acide férulique dans les deux formes monomères ou polymères que le péricarpe du blé dur (Greffeuille *et al.*, 2007).

L'acide férulique existe aussi dans la paroi cellulaire de l'embryon, mais la couche scutellum contient un taux plus élevé d'acide phénolique en particulier le dihydrodimère férulate que la couche embryonnaire, alors que la couche hyaline contient principalement une grande quantité des monomères d'acide férulique (Barron *et al.*, 2007) et des dihydrodiferulates

concentrés dans le film gras (péricarpe externe) et les cellules croisées (Parker et al., 2005), alors que l'acide p-coumarique est localisé principalement dans la couche à aleurone du grain (Antoine et al., 2004).

Les cellules du péricarpe interne et le tégument semblent être les plus largement lignifiées, tandis que la lignification des parois cellulaires du péricarpe externe est moins (Schwarz et al., 1988). Rodionova et al. (1992) n'ont pas trouvé la lignine dans la couche à aleurone et la couche endosperme du grain de blé. Dans la littérature, le son de céréales est souvent décrit comme hautement lignifié (Bunzel et al., 2004).

L'enveloppe du grain de blé rouge d'hiver contient deux minces cuticules (interne et externe) entourant une couche centrale de couleur forte, qui contient les tanins (Bradbury et al., 1956). Nagao et al. (1957) ont suggéré que les pigments du tégument des grains mûrs soient des « phlobaphènes » formés par l'oxydation des proanthocyanidines (Mccallum et Walker, 1990).

7. Méthodes d'extraction, de dosage et d'identification des composés polyphénoliques

7.1. Méthodes d'extraction

La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature chimique qui peut varier du simple à très hautement polymérisée. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, des phénylpropanoïdes, d'anthocyanes et des tannins, etc. Il y a une possibilité d'interaction des composants phénoliques avec d'autres composés tels que les glucides et les protéines. Ces interactions peuvent conduire à la formation des complexes insolubles. La solubilité des composés phénoliques est également affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de mettre au point une procédure d'extraction appropriée pour l'extraction de tous les composés phénoliques végétaux. Les extraits phénoliques des matières végétales constituent toujours un mélange diversifié des composés phénoliques solubles pour les plantes dans le système de solvants utilisés. Des étapes supplémentaires peuvent être nécessaires pour éliminer les composés phénoliques indésirables et les substances non phénoliques tels que les cires, les terpènes, les graisses et les chlorophylles. Des solvants (le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide) et leurs combinaisons avec des proportions différentes de l'eau ont également été utilisés pour l'extraction des composés phénoliques (Naczka et Shahidi, 2006).

7.2. Méthodes de dosage et d'identification

Historiquement, la méthode colorimétrique la plus commune employée pour la quantification des acides phénoliques est la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier entraîne la réduction de l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique à un complexe de couleur bleu en milieu alcalin. Le complexe phosphomolybdique-phosphotungsticphenol généré en solution donne une absorbance facilement détectée à 760 nm. Cependant, la quantification est problématique, d'autres composants dans les extraits se comportent comme agents réducteurs. L'identification individuelle des composés phénoliques n'est pas possible avec cette méthode. Au cours des vingt dernières années, la technique d'analyse qui a dominé la séparation et la caractérisation de composés phénoliques est HPLC avec phase inversée de technologie de la colonne. Beaucoup de critiques sur les composés phénoliques ont porté sur les flavonoïdes avec une section consacrée aux acides phénoliques. Seules quelques-unes ont porté exclusivement sur les techniques de séparation pour les acides phénoliques (Robbins, 2003). Par ailleurs, différentes techniques chromatographiques ont été employées pour la séparation, l'isolement, la purification et l'identification des composés phénoliques. Les procédures chromatographiques ont également été utilisées pour étudier l'interaction des composés phénoliques avec les autres composants alimentaires (Naczki et Shahidi, 2006).

Partie 02.
Matériel et
Méthodes

Ce travail est réalisé au sein des laboratoires pédagogiques de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologie Agro-Alimentaire (INATAA), université Mentouri-Constantine.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel végétal

Les analyses effectuées ont porté sur les grains de quatre variétés de blé dur qui nous ont été fournies par le CCLS de Constantine. Elles ont été stockées à 04 °C durant huit mois. Ces variétés diffèrent par l'origine génétique et les lieux de sélection. La variété Mohamed Ben Bachir (MBB) provient d'une sélection effectuée dans une population locale (1931), elle a été sélectionnée à l'ITGC de Sétif. La variété CIRTA (Hedba/ Gd ovz 619) est sélectionnée localement à l'ITGC de Khroub. La variété SIMETO (Sersou) est introduite d'Italie et la variété VITRON (Horrar) est introduite d'Espagne, ces deux dernières variétés ont été sélectionnées à l'ITGC de Tiaret (ITGC, 2006).

Les grains de chaque variété ont été divisés en deux lots, le premier regroupe des échantillons supposés altérés dont les grains présentent des symptômes d'altération (grains échaudés, grains avariés ou moisissés, grains chauffés, grains insectisés, grains cécidomyés, etc. (Feillet, 2000) et le deuxième regroupe des échantillons supposés sains dont les grains ne présentent aucun aspect d'altération.

Dans le but de connaître la contamination fongique profonde de celle superficielle des grains, nous avons procédé, après avoir classé les grains en deux lots "sains et altérés", à la désinfection de la surface des grains par l'éthanol 70 %.

II.2. METHODES

II.2.1. Détermination du taux d'humidité

Il est obtenu par la dessiccation à l'étuve d'une prise d'essai de 5 g de grains entiers broyés à 103±2 °C, jusqu'à ce que le poids devienne pratiquement constant. Le taux d'humidité est défini comme étant la perte de poids subie lors de la dessiccation. La détermination du taux d'humidité se fait par le calcul de la différence de poids avant et après la dessiccation selon la formule suivante :

$$H \% = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

H% : taux d'humidité en %.

M1 : masse en g avant étuvage (échantillon + capsule).

M2 : masse en g de l'ensemble (échantillon + capsule) après étuvage.

II.2.2. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux

II.2.2.1. Extraction des polyphénols totaux

La méthode d'extraction des polyphénols totaux employée est celle décrite par Zieliński et Kozłowska (2000) et modifiée par Oufnac (2006), dix grammes de grains de blé broyés de chaque échantillon ont été transférés dans des tubes à essai. Par la suite, 40 ml de méthanol (90%, v/v) ont été ajoutés dans ces tubes, puis vortexés pour mélanger l'ensemble. Les tubes à essai ont été couverts et placés dans un bain d'eau à 60°C pendant 20 minutes. Ils ont été vortexés deux fois pendant l'incubation. Les deux phases liquide et solide de chaque tube à essai ont été séparées par centrifugation à 2000 rpms pendant 15 minutes. Le surnageant (phase liquide) a été transféré et le résidu (phase solide) a été mélangé à 20 ml du même solvant pour lancer la deuxième extraction. Le deuxième surnageant a été combiné avec le précédent. Le tube contenant les deux surnageants a été alors placé dans un rotavapor pour enlever le solvant. L'extrait sec a été pesé pour évaluer le rendement d'extraction des échantillons (Figure 08).

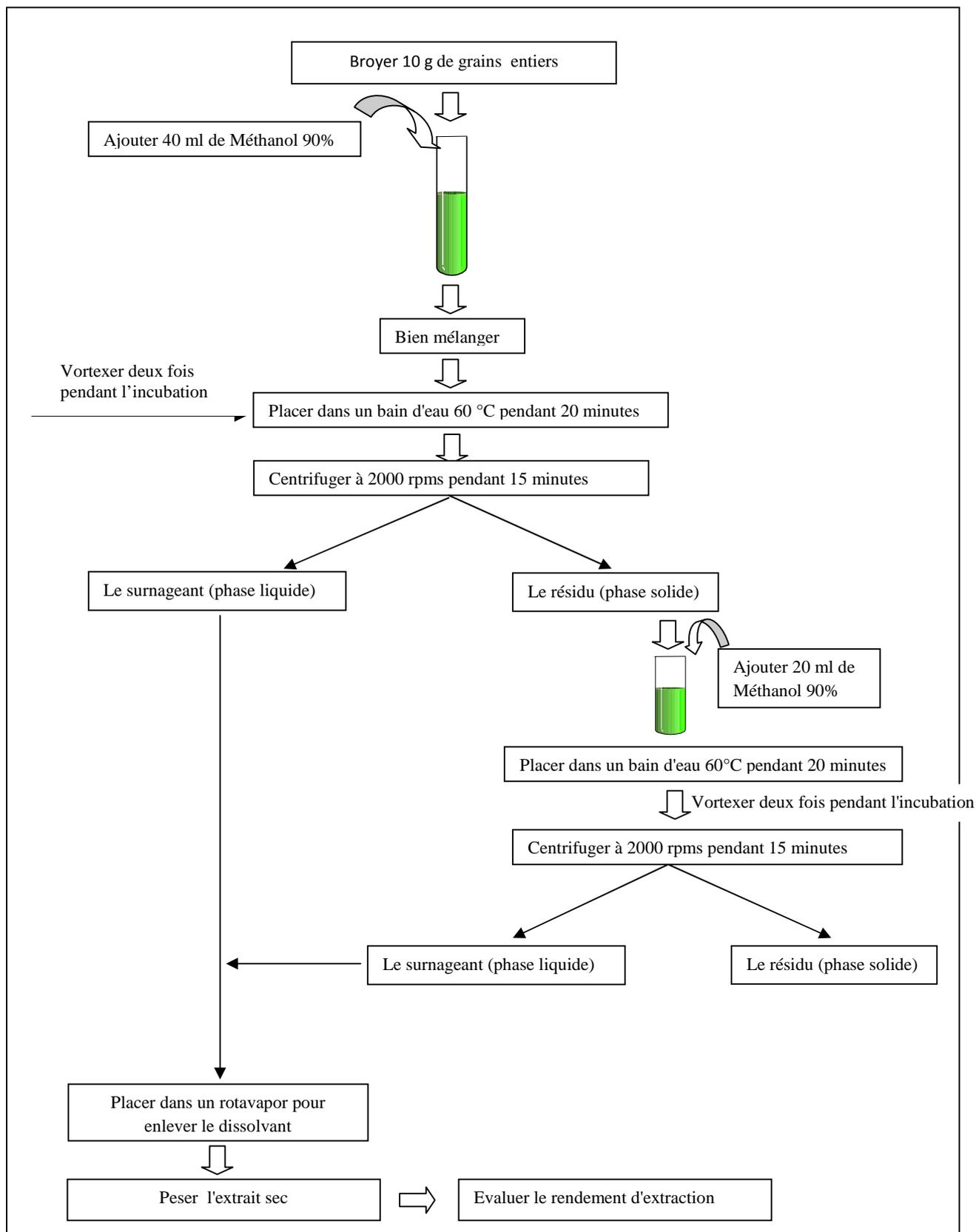


Figure 08. Extraction des polyphénols totaux.

II.2.2.2. Evaluation des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait des grains de blé a été déterminée par la méthode décrite par Velioglu *et al.* (1998), en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu diluée 10 fois avec de l'eau distillé. 0.020 g de l'extrait sec des grains de blé sont dissout dans 1 ml de méthanol (90%), 0.1 ml de cette solution d'extrait de grains est mélangé à 0.75 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué. La solution de la réaction est laissée à température ambiante pendant 5 minutes. 0.75ml de la solution de bicarbonate de soude (60 g/l) est y ajouté. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 90 minutes. L'absorbance de la solution est déterminée à 750 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Évident. L'essai est triplé pour chaque extrait. L'absorbance, ramenée à une moyenne, est employée dans le calcul. L'acide gallique a été employé comme standard pour la courbe d'étalonnage (annexe II). Le contenu en polyphénols totaux est exprimé en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (Figure 09).

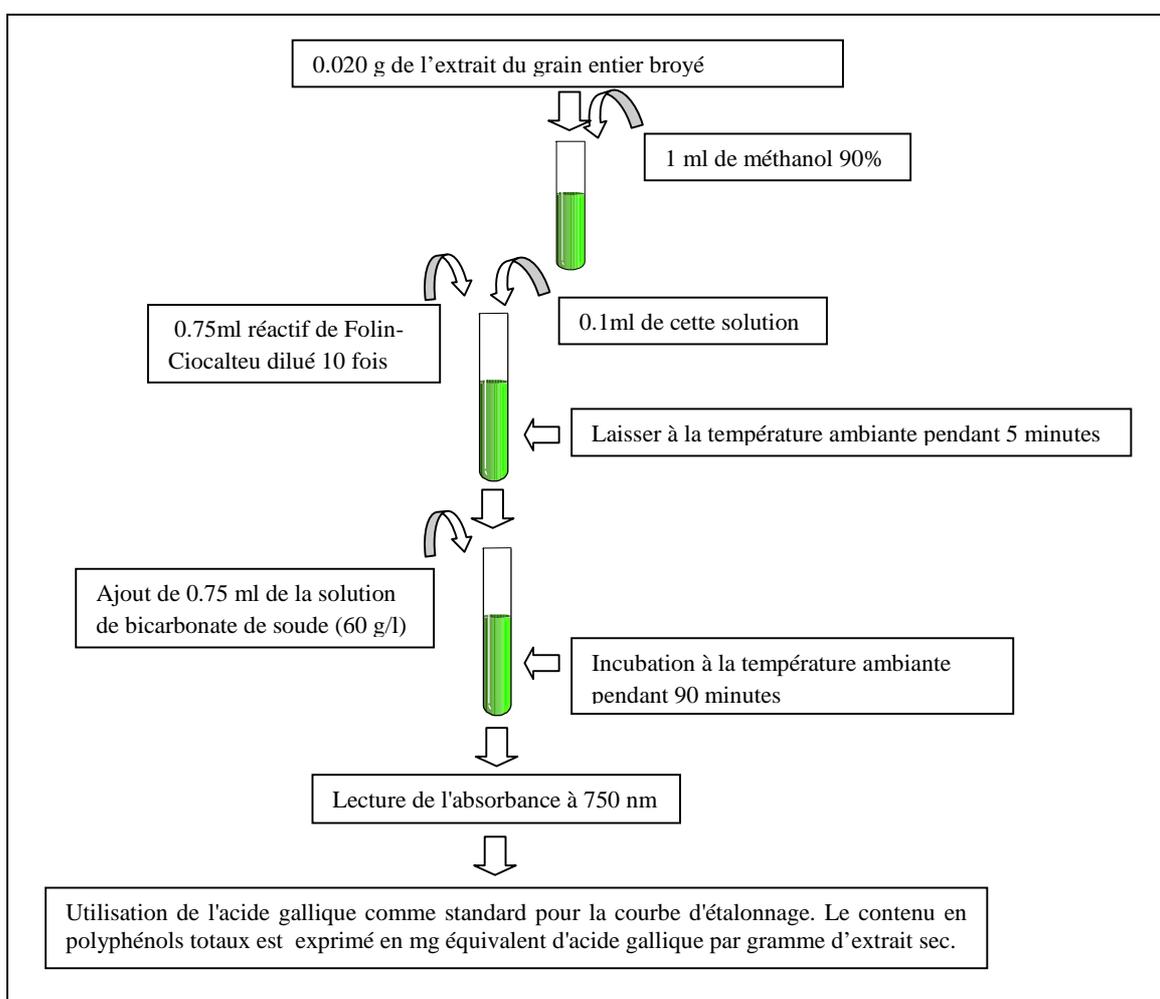


Figure 09. Evaluation des polyphénols totaux à partir de l'extrait sec.

II.2.3. Analyse mycologique

Cette partie décrit les techniques et les milieux appropriés pour l'isolement et l'identification des mycètes.

Dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à l'identification de la mycoflore dans les échantillons sains et altérés de quatre variétés de blé dur : MBB, SIMETO, CIRTA et VITRON.

II.2.3. 1. Techniques d'énumération

La quantification de la croissance des mycètes filamenteux est plus difficile que celle des bactéries ou des levures. La croissance végétative se compose des hyphes, qui ne sont pas aisément détachés du substrat. Quand la sporulation se produit, de nombreuses spores peuvent être produites, provoquant des élévations appréciables de cellules viables, sans augmentation de biomasse. L'évaluation de la croissance fongique ou de la biomasse n'est pas facile parce qu'aucune norme primaire n'existe (comme le cas des levures et des bactéries). Malgré l'amélioration des techniques de mesure de la biomasse récemment, la plupart des laboratoires continuent à se baser sur le compte viable (méthode de dilution) pour détecter et quantifier la croissance fongique dans les aliments. Une deuxième méthode standard connue en tant que la méthode directe, a été développée pour estimer le nombre et la croissance des souches fongiques (Pitt et Hocking, 2009).

II.2.3. 2. Isolement et purification des moisissures

II.2.3. 2.1. Méthode directe

L'isolement des moisissures à partir des échantillons (sains et altérés) des variétés analysées (MBB, SIMETO, CIRTA et VITRON) a été effectué selon la méthode directe proposée par Champion (1997). Les grains de blé sélectionnés au hasard de chaque échantillon sont placés sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) à l'aide d'une pince, préalablement désinfectée à l'alcool et flambée en passant d'une boîte à l'autre. Le nombre de grains déposés dans les boîtes de Pétri est huit grains. La mise en incubation des grains est réalisée sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) (Branger *et al.*, 2007). L'incubation des boîtes ensemencées doit être réalisée dans un environnement favorable au développement des champignons recherchés. Les champignons doivent pouvoir former du mycélium, donner des spores ou provoquer des symptômes typiques sur les jeunes plantules. Les conditions standard d'incubation indiquées par l'ICFM sont 25°C et l'incubation pendant 5 jours

(Hocking *et al.*, 2006). Les résultats des analyses par ensemencement direct sont exprimés en taux de particules contaminés.

II.2.3. 2.2. Etude des caractères macroscopiques

Selon Guiraud (2003) et Branger *et al.* (2007), la détermination des caractères culturaux des moisissures fait appel aux caractères suivants:

- ✓ Etude de la colonie sur boîte de Pétri en utilisant des milieux différents car l'aspect change en fonction de la composition ;
- ✓ Mesure de la vitesse de croissance ;
- ✓ Observation de la texture et de l'épaisseur de la colonie ;
- ✓ Couleur de la colonie ;
- ✓ Aspect de la marge ;
- ✓ Odeur ;
- ✓ Présence ou non de gouttelettes d'exsudation.

II.2.3. 2.3. Etude des caractères microscopiques

L'observation microscopique peut se faire soit directement sur la boîte de Pétri, soit après un montage entre lame et lamelle, soit, ce qui est le plus souhaitable, après une culture sur lame. L'observation doit porter sur l'aspect du mycélium (hyphe ou siphon) et sur les caractères et la disposition des organes sporifères. Il est alors relativement facile d'arriver jusqu'au nom de genre de la moisissure. L'identification des moisissures est effectuée en utilisant un schéma taxonomique basé sur les caractères morphologiques (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 2003). Après identification des genres contaminants des grains analysés, un pourcentage des grains contaminés par tel ou tel genre a été calculé (Tahani *et al.*, 2008).

➤ Préparation des frottis de moisissures pour la microscopie

D'après Pitt et Hocking (2009), les mycètes sont examinés au microscope en tant que frottis humides. Pour préparer un frottis humide, on utilise une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. De plus, on prend les structures qui peuvent enfermer les spores (cléistothèce), etc., près du centre de la colonie, où la probabilité de trouver des spores à maturité est plus grande. Les coupes d'échantillon posées sur une lame sont d'abord « mouillées » avec une goutte d'éthanol à 70%. Quand la majeure partie de l'éthanol s'est évaporée, on ajoute une goutte d'acide

lactique (pour la phase ou le système optique de contraste d'interférence) ou un colorant de lactophénol pour le champ lumineux, puis on pose une lamelle de couverture. Le liquide en excès est épongé doucement avec une serviette ou un papier absorbant. On procède ensuite à l'examen au microscope (grossissement $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$).

II.2.3. 2.4. Purification et conservation des souches

Les souches des moisissures sont isolées sur les mêmes milieux utilisés pour leur dénombrement. Une fois isolées, les souches sont purifiées par repiquages successifs sur le milieu d'isolement convenable. Les souches pures sont repiquées sur le même milieu coulé en ponte dans des tubes à vis, puis conservés à 4 °C.

Les souches isolées seront codées en prenant l'initiative de la variété et l'état sanitaire ("S" pour sain et "A" pour altéré) de l'échantillon considéré (Tableau 03).

Tableau 03. Codage des souches isolées et purifiées des échantillons sains et altérés de chaque variété

| Variété | Echantillon sain | Echantillon altéré |
|---------------|---------------------|---------------------|
| MBB | MS1, MS2, MS3, etc. | MA1, MA2, MA3, etc. |
| CIRTA | CS1, CS2, CS3, etc. | CA, CA2, CA3, etc. |
| VITRON | VS1, VS2, VS3, etc. | VA1, VA2, VA3, etc. |
| SEMTO | SS1, SS2, SS3, etc. | SA1, SA2, SA3, etc. |

II.2.4. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits polyphénoliques *in vitro* a été réalisée par la méthode de contact directe (Bhalodia *et al.*, 2011; Satish *et al.*, 2010).

Les souches de moisissures testées sont celles isolées à partir des variétés de blé (MBB, SIMETO, CIRTA et VITRON). En effet de chaque genre, nous avons testé une souche. Ces souches sont: *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aureobasidium sp.* et *Bipolaris sp.*

4 g de chaque extrait polyphénolique ont été solubilisés dans 10 ml de mélange constitué de 50% d'eau distillée et de 50% du Diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce mélange a une concentration de 400 mg/ml. Par la suite, il a été dilué à des concentrations de 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml et 25 mg/ml. Ces mélanges ont été ajoutés au milieu PDA stérile en surfusion

pour obtenir différentes concentrations : 2.5, 5, 10, 20 et 40 mg/ml. L'inoculation s'est effectuée par le dépôt, au centre de la boîte, d'un disque du mycélium d'environ 0.6 cm de diamètre d'une pré-culture de 3 à 7 jours. Après incubation à 26 ± 1 °C pendant 2 à 7 jours, en tenant compte de la croissance du témoin (PDA sans extrait polyphénoliques), on compare l'action des extraits polyphénoliques pour les différentes concentrations sur la croissance mycélienne.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) ; qui est déterminé par la formule suivante (Satish *et al.*, 2010):

$$PI = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : Diamètre de croissance de la moisissure estimée sur milieu témoin.

B : Diamètre de croissance de la moisissure estimée en présence de l'extrait à tester.

De l'équation de régression linéaire entre les concentrations (en abscisse) et les pourcentages d'inhibition de la croissance (en ordonnée), on détermine les concentrations réduisant 50% (CI50) la croissance mycélienne.

II.3. Etude statistique

Les moyennes plus ou moins l'écart type de l'extrait sec, la teneur en polyphénols totaux et le taux d'humidité des trois essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2007.

En ce qui concerne l'impact de l'effet variétal, les données obtenues sur la teneur en polyphénols totaux de différentes variétés de blé ont été traitées par analyse de la variance (ANOVA). La comparaison entre les taux d'humidité des variétés de blé est analysée aussi par l'ANOVA en utilisant le logiciel statistique XLSTAT 2008. Les différences ont été considérées significatives à $p \leq 0,05$.

Des corrélations entre les différents paramètres (le taux d'extrait sec, la teneur en polyphénols totaux, l'humidité et le pourcentage de contamination) ont été également recherchées à l'aide du logiciel statistique XLSTAT 2008.

Partie 03.
Résultats et
Discussion

III. Résultats

III.1. Evaluation du taux d'humidité et de la teneur en polyphénols totaux

III.1.1. Taux d'humidité

D'une manière générale, un faible taux d'humidité a été constaté pour l'ensemble des échantillons analysés. Ce taux varie de 10,40 à 12,51 % (Tableau 04).

Tableau 04. Taux moyen d'humidité des échantillons analysés exprimé en pourcentage (%)

| Variété Echantillon | MBB | | VITRON | | CIRTA | | SIMETO | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| Taux moyen d'humidité des échantillons | 10,45 ±0,19 | 10,83 ±0,42 | 11,43 ±0,15 | 12,51 ±1,80 | 11,03 ±0,10 | 10,89 ±0,30 | 10,40 ±0,08 | 11,79 ±0,05 |
| Taux moyen d'humidité des variétés | 10.64 ± 0.30 | | 11.79 ± 0.97 | | 10.96 ± 0.20 | | 11.09 ± 0.06 | |

Les résultats de l'analyse de variance mettent en évidence l'absence de différence significative ($p \leq 0.05$) entre les variétés analysées; ces dernières ont été regroupées en un seul groupe homogène (Tableau 05). Ainsi, Sur le plan intravariétal ou échantillonnage (échantillon sain et échantillon altéré de la même variété) et sur le plan inter variétal (échantillons sains et échantillons altérés des variétés entre eux), l'analyse de la variance montre qu'il n'y a pas de différence significative ($p \leq 0.05$) et sont regroupées aussi en un seul groupe homogène (Tableau 06).

Tableau 05. Analyse des différences entre les taux d'humidité des variétés de blé analysés par le test de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$)

| Variété | Moyenne estimée |
|---------|---------------------|
| MBB | 10,640 ^a |
| CIRTA | 10,959 ^a |
| VITRON | 11,095 ^a |
| SIMETO | 11,970 ^a |

la même lettre signifie absence de différence significative

Tableau 06. Analyse des différences entre les taux d’humidité des échantillons analysés par le test de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$)

| Variété | Moyenne estimée | |
|---------------|---------------------|----------------------|
| | Echantillons sains | Echantillons altérés |
| MBB | 10,454 ^a | 10,826 ^a |
| CIRTA | 11,026 ^a | 10,892 ^a |
| VITRON | 11,432 ^a | 12,507 ^a |
| SIMETO | 10,400 ^a | 11,790 ^a |

la même lettre signifie absence de différence significative

III.1. 2. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux

III.1. 2.1. Rendement en extrait sec

Les extraits méthanoliques, récupérés après évaporation, ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant; ces extraits renferment les polyphénols totaux. Le tableau 07 présente le rendement en extrait sec en g par 10 g des grains entiers broyés (échantillons sains et altérés séparément). Ainsi, nous avons constaté d’après les résultats obtenus que le rendement en extrait sec de 10g de l’échantillon sain est supérieur à celui de l’échantillon altéré.

Tableau07. Rendement moyen en extrait sec exprimé en g/10 g des échantillons analysés

| Variété Echantillon | MBB | | VITRON | | CIRTA | | SIMETO | |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| Rendement moyen des échantillons | 0,368 ±0,02 | 0,333 ±0,01 | 0,356 ±0,01 | 0,340 ± 0,01 | 0,355 ± 0,01 | 0,315 ± 0,02 | 0,337 ±0,02 | 0,309 ± 0,01 |
| Rendement moyen des variétés | 0.350 ± 0.015 | | 0.348 ± 0.010 | | 0.335 ± 0.015 | | 0.323 ± 0.015 | |

Par ailleurs, l’analyse de la variance montre qu’il y a une différence significative ($p \leq 0.05$) entre les rendements moyens en extrait sec des variétés analysées; celles-ci ont été rassemblées en deux groupes différents (Tableau 08).

Sur le plan intra-variétal (échantillon sain et échantillon altéré de la même variété), l’analyse de la variance montre qu’il n’y a pas de différence significative pour le rendement moyen en extrait sec exprimé en g par 10g d’échantillon analysé.

Sur le plan inter-variétal, l'analyse de variance ne montre aucune différence significative pour les différents échantillons sains entre eux, de même pour les échantillons altérés entre eux. Par contre, il y a une différence significative ($p \leq 0.05$) entre l'échantillon sain de la variété MBB et l'échantillon altéré de la variété CIRTA, l'échantillon sain de la variété MBB et l'échantillon altéré de la variété SIMETO, l'échantillon sain de la variété VITRON et l'échantillon altéré de la variété CIRTA, l'échantillon sain de la variété VITRON et l'échantillon altéré de la variété SIMETO, l'échantillon altéré de la variété CIRTA et l'échantillon sain de la variété SIMETO ; ces échantillons sont rassemblés en trois groupes différents (Tableau 09).

Tableau 08. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$)

| Variété | Moyenne estimée |
|---------|-----------------------|
| MBB | 0.323 ^b |
| CIRTA | 0.335 ^b |
| VITRON | 0.348 ^{a, b} |
| SIMETO | 0.351 ^a |

la même lettre signifie absence de différence significative

Tableau 09. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les échantillons (sains et altérés) des variétés analysées pour le rendement en extrait sec ($p \leq 0.05$)

| Variété | Moyenne estimée | |
|---------|--------------------------|--------------------------|
| | Echantillons sains | Echantillons altérés |
| MBB | 0,368 ^c | 0,333 ^{a, b, c} |
| CIRTA | 0,355 ^{b, c} | 0,315 ^{a, b} |
| VITRON | 0,356 ^c | 0,340 ^{a, b, c} |
| SIMETO | 0,337 ^{a, b, c} | 0,309 ^a |

la même lettre signifie absence de différence significative

III.1.2.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des variétés étudiées, en termes d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec, est présentée dans le tableau 10. Sur le plan variétal, la plus forte teneur en composés polyphénoliques totaux a été constatée dans l'extrait de la variété SIMETO, et la plus faible chez la variété CIRTA; ces teneurs sont équivalentes respectivement à

1,781 ± 0,065 et 1,606 ± 0,085 mg EAG /g d'extrait sec des grains entiers broyés. Sur le plan échantillonnage, nous avons constaté que l'échantillon sain présente une teneur plus élevée en polyphénols totaux par rapport à l'échantillon altéré pour chaque variété (Annexe II).

Tableau 10. Teneur moyenne des polyphénols totaux exprimée en mg EAG/g d'extrait sec des grains entiers analysés

| Variété Echantillon | MBB | | VITRON | | CIRTA | | SIMETO | |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| Teneur moyenne des polyphénols totaux des échantillons | 1,900± 0,04 | 1,568 ±0,03 | 1,849 ±0,09 | 1,698 ± 0,02 | 1,713 ± 0,08 | 1,500 ± 0,09 | 1,880 ±0,11 | 1,683± 0,02 |
| Teneur moyenne des polyphénols totaux des variétés | 1.734 ± 0.035 | | 1.773 ± 0.055 | | 1.606 ± 0.085 | | 1.781 ± 0.065 | |

D'une manière générale, l'analyse de la variance montre qu'il y a une différence significative ($p \leq 0.05$) entre les variétés analysées; elles ont été regroupées en deux groupes différents (Tableau 11).

Sur le plan intravariétal (échantillon sain et échantillon altéré de la même variété), l'analyse de la variance montre qu'il y a une différence significative pour la teneur des polyphénols totaux exprimée en mg EAG/g d'extrait sec des variétés MBB et CIRTA. Par contre, il n'y a aucune différence significative pour les variétés VITRON et SIMETO.

Sur le plan inter-variétal, l'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les échantillons sains entre eux pour la teneur des polyphénols totaux exprimée en mg EAG/g d'extrait sec des grains entiers analysés. Ce constat est valable aussi pour les échantillons altérés entre eux. Par contre, il y a une différence significative ($p \leq 0.05$) entre l'échantillon sain de la variété MBB et l'échantillon altéré de la variété VITRON, l'échantillon sain de la variété MBB et l'échantillon altéré de la variété CIRTA, l'échantillon sain de la variété MBB et l'échantillon altéré de la variété SIMETO, l'échantillon altéré de la variété MBB et l'échantillon sain de la variété VITRON, l'échantillon altéré de la variété MBB et l'échantillon sain de la variété SIMETO, l'échantillon sain de la variété VITRON et l'échantillon altéré de la variété CIRTA, l'échantillon altéré de la variété VITRON et l'échantillon altéré de la variété CIRTA, l'échantillon altéré de la variété CIRTA et l'échantillon sain de la variété SIMETO. Ces échantillons sont regroupés en quatre groupes différents (Tableau 12).

Tableau 11. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les variétés analysées pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0.05$)

| Variété | Moyenne estimée |
|---------|-----------------------|
| MBB | 1.734 ^{a, b} |
| CIRTA | 1.773 ^b |
| VITRON | 1.606 ^a |
| SIMETO | 1.782 ^b |

la même lettre signifie absence de différence significative

Tableau 12. Analyse des différences par le test de Tukey (HSD) entre les échantillons (sains et altérés) pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0.05$)

| Variété | Moyenne estimée | |
|---------|--------------------------|--------------------------|
| | Echantillons Sain | Echantillons Altéré |
| MBB | 1,900 ^a | 1,568 ^{c, d} |
| CIRTA | 1,713 ^{a, b, c} | 1,500 ^d |
| VITRON | 1,849 ^{a, b} | 1,698 ^{b, c} |
| SIMETO | 1,880 ^{a, b} | 1,683 ^{b, c, d} |

la même lettre signifie absence de différence significative

III.2. Analyse mycologique

III.2. 1. Isolement des moisissures

Au terme de l'analyse mycologique, nous avons obtenu 159 souches de moisissures dans les échantillons (sains et altérés) des variétés analysées de blé dur. Il est à constater que chez les échantillons supposés sains, le taux de leur contamination s'est révélé très élevé malgré leur apparence saine. Sur le plan variétal, les souches isolées sont réparties comme suite : 43 souches à partir de la variété MBB, 41 souches à partir de la variété SIMETO, 38 souches à partir de la variété CIRTA et 37 souches sont isolées à partir de la variété VITRON. La figure 10 représente le pourcentage de contamination de chaque variété. Sur le plan échantillonnage, nous avons constaté d'après la figure 11 que le pourcentage de contamination est plus élevé chez l'échantillon altéré que chez l'échantillon sain pour chaque variété.

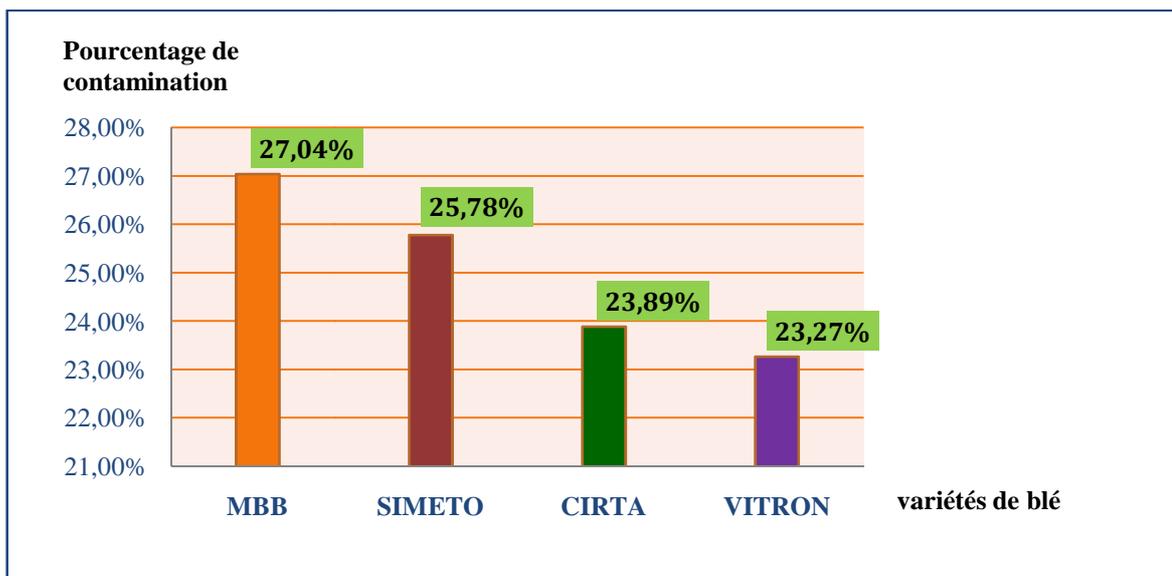


Figure 10. Pourcentage de contamination de chaque variété analysée

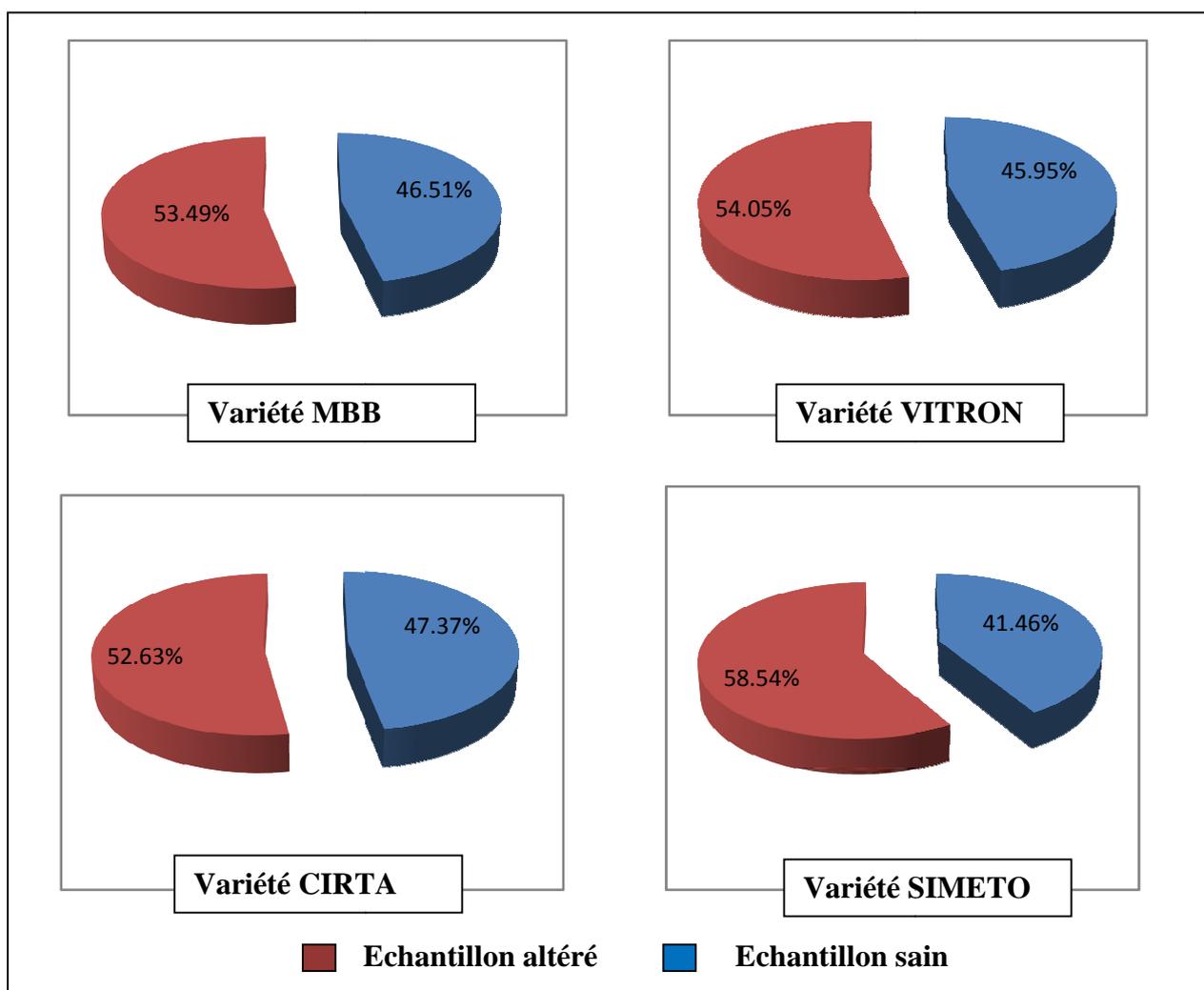


Figure 11. Pourcentage de contamination des échantillons sains et altérés des variétés analysées.

III.2. 2. Identification des genres

L'identification des genres des moisissures a reposé sur l'étude des caractères cultureux (aspect des colonies et de leur revers, couleur, etc.) et des caractères morphologiques révélés par un examen microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

III.2.2.1. Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches, isolées des échantillons et cultivées sur milieu PDA (Annexe III), sont présentés dans les tableaux 13 (échantillon sain) et 14 (échantillon altéré) pour la variété MBB, 15 (échantillon sain) et 16 (échantillon altéré) pour la variété CIRTA, 17 (échantillon sain) et 18 (échantillon altéré) pour la variété VITRON et 19 (échantillon sain) et 20 (échantillon altéré) pour la variété SIMETO.

Tableau 13. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété MBB

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | | |
|--------------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|---|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation | |
| Echantillon : « grains sains » | MS 1 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 15 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| | MS 17 | Vert foncé entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Vert foncé | + |
| | MS 3 | Gris-marron entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 4 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 5 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 6 | Gris-marron entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 8 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 12 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| | MS 9 | Gris-marron entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 10 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | MS 13 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| | MS 7 | Vert entouré d'une zone claire | plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| | MS 11 | Vert entouré d'une zone claire | plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| | MS 14 | Noir entouré d'une zone jaune claire | plate | Granuleuse | | Jaune pâle | |
| | MS 16 | Vert entouré d'une zone claire | plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| | MS 18 | Vert entouré d'une zone claire | plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| | MS 19 | Vert entouré d'une zone claire | plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| | MS 20 | Vert entouré d'une zone claire | plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| | MS 2 | Violet | En dôme au centre puis devient plate | Poudreuse | Non | Violet | - |

Tableau 14. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées de l'échantillon altéré de la variété MBB

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation |
| MA4 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA6 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA7 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA8 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA9 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA10 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA13 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA18 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA19 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA20 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA22 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| MA1 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| MA2 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| MA3 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| MA5 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| MA11 | Marron à vert foncé au centre puis devient claire | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| MA14 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| MA12 | Vert entouré d'une zone claire | Plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| MA15 | Vert entouré d'une zone claire | Plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| MA16 | Vert entouré d'une zone claire | Plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| MA17 | Vert entouré d'une zone claire | Plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| MA21 | Vert entouré d'une zone claire | Plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |
| MA23 | Vert entouré d'une zone claire | Plate | Poudreuse | Non | Jaune claire | - |

Tableau 15. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété CIRTA

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | | |
|--------------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|---|---|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation | |
| Echantillon : « grains sains » | CS 2 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| | CS 3 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | CS 4 | Noir olivâtre blanc entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| | CS 5 | Noir olivâtre blanc entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| | CS 6 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | CS 7 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | CS 14 | Vert foncé | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse | Non | Vert foncé | + |
| | CS 18 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | CS 13 | Rose clair puis devient foncé puis devient plus clair | Plate | Poudreuse | Non | Jaune-marron clair puis devient marron puis devient Jaune-marron plus clair | - |
| | CS 15 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |
| | CS 16 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Jaune pâle | - |
| | CS 17 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |
| | CS 8 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CS 9 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CS 10 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CS 11 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CS 12 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| CS 1 | Brun-vert | En dôme | Veloutée | Non | Rose foncé | + | |

Tableau 16. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon altéré de la variété CIRTA

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | | |
|----------------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|--|---|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation | |
| Echantillon : « grains altérés » | CA1 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 2 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 3 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 4 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 5 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 6 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 7 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 9 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 10 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 12 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 13 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 14 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | CA 11 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |
| | CA 15 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Jaune | - |
| | CA 16 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Jaune | - |
| | CA 18 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |
| | CA 19 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |
| | CA 8 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |
| | CA 20 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse | Non | Gris-marron foncé entouré d'une zone jaune-marron claire | + |
| | CA 17 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |

Tableau 17. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété VITRON

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation |
| VS3 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| VS 4 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| VS 5 | Gris-vert foncé entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse | Non | Gris-vert foncé | + |
| VS 6 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| VS 7 | Vert foncé entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse | Non | Vert foncé | + |
| VS 8 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| VS 9 | Vert foncé entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse | Non | Vert foncé | + |
| VS 10 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| VS 11 | Gris-vert foncé | Plate | Duveteuse | Non | Gris-vert foncé | + |
| VS 12 | Noir olivâtre blanc entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| VS 14 | Noir olivâtre blanc entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| VS 15 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| VS 16 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| VS 17 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| VS 1 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| VS 13 | Rose au centre puis devient plus claire au périphérique | Plate | Cotonneuse | Non | Rose | + |
| VS 2 | Gris-vert entouré d'une zone blanche | Plate | Granuleuse | Non | Blanc | - |

Tableau 18. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon altéré de la variété VITRON

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation |
| VA 1 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | plate | duveteuse | non | Noir olivâtre | + |
| VA 2 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | plate | duveteuse | non | Gris vert foncé | + |
| VA 3 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | plate | duveteuse | non | Gris vert foncé | + |
| VA 5 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 6 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 7 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 8 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 9 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 10 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | plate | duveteuse | non | Gris vert foncé | + |
| VA 11 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 12 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 13 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | plate | duveteuse | non | Noir olivâtre | + |
| VA 18 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | plate | duveteuse | non | Noir olivâtre | + |
| VA 20 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | duveteuse à laineuse | non | Jaune-marron foncé | + |
| VA 14 | Blanc puis devient gris | En dôme | cotonneuse | oui | Blanc | - |
| VA 15 | Blanc puis devient gris | En dôme | cotonneuse | oui | Blanc | - |
| VA 16 | Blanc puis devient gris | En dôme | cotonneuse | oui | Blanc | - |
| VA 17 | Blanc puis devient gris | En dôme | cotonneuse | oui | Blanc | - |
| VA 4 | Brun vert | En dôme | veloutées | non | Rose foncé | + |
| VA 19 | Brun olivâtre foncé | plate | duveteuse | non | Brun olivâtre foncé | - |

Echantillon : « grains altérés »

Tableau 19. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon sain de la variété SIMETO

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | | |
|--------------------------------|-------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|---|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation | |
| Echantillon : « grains sains » | SS 3 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 5 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 7 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 8 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 9 | Gris vert foncé | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| | SS 11 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 12 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 13 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| | SS 15 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| | SS 2 | Gris vert foncé | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| | SS 1 | Brun-vert | En dôme | Veloutées | Non | Rose foncé | + |
| | SS 10 | Brun-vert | En dôme | Veloutées | Non | Rose foncé | + |
| | SS 16 | Brun-vert | En dôme | Veloutées | Non | Rose foncé | + |
| | SS 17 | Brun-vert | En dôme | Veloutées | Non | Rose foncé | + |
| | SS 4 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | SS 6 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| | SS 14 | Rose pâle avec un point jaune au centre | En dôme | Cotonneuse | Non | Rose | + |

Tableau 20. Caractères macroscopiques des souches des moisissures isolées à partir de l'échantillon altéré de la variété SIMETO

| Code de la souche | Recto de la boîte | | | | Verso de la boîte | |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| | Couleur | Forme | Texture | Caractère envahissant | Couleur | Pigmentation |
| SA12 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 13 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 16 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 17 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 18 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 19 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 20 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 21 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 22 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 23 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 14 | Blanc puis devient gris | En dôme | Cotonneuse | Oui | Blanc | - |
| SA 1 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| SA 2 | Gris vert foncé | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| SA 4 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| SA 5 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| SA 7 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| SA 9 | Noir olivâtre entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Noir olivâtre | + |
| SA 10 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| SA 3 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| SA 11 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| SA 14 | Jaune-marron-blanc entouré d'une zone blanche | En dôme au centre puis devient plate | Duveteuse à laineuse | Non | Jaune-marron foncé | + |
| SA 6 | Gris vert foncé entouré d'une zone blanche | Plate | Duveteuse | Non | Gris vert foncé | + |
| SA 8 | Brun olivâtre foncé | Plate | Duveteuse | Non | Brun olivâtre foncé | - |
| SA 15 | Brun-vert | En dôme | Veloutée | Non | Rose foncé | + |

Echantillon : « grains altérés »

III.2. 2.2. Etude microscopique

Cent cinquante neuf isolats fongiques ont été obtenus à partir des échantillons analysés. Ils représentent 7 genres dont le classement par ordre de prévalence est *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Fusarium* et *Bipolaris*, et en dernière position le genre *Penicillium*.

La figure 12 récapitule les taux de contamination des genres isolés des échantillons (sains et altérés) analysés.

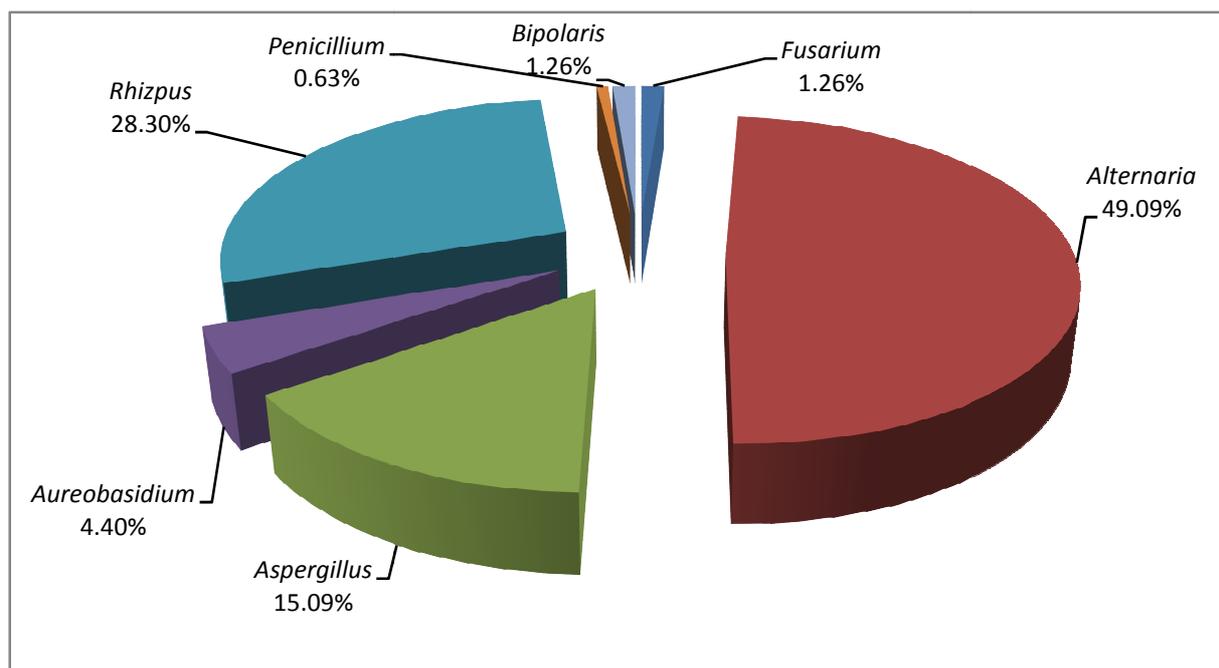


Figure 12. Taux de contamination des échantillons analysés par les principaux genres isolés.

III.2.2.2.1. Variété MBB

Quatre différents genres ont été identifiés à partir des souches isolées des échantillons sains et altérés analysés de la variété MBB. Ces genres sont : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus* (Tableaux 21 et 22). L'échantillon sain s'est révélé contaminé par des souches appartenant à trois genres différents, dont *Alternaria* est le plus dominant avec 60 %, suivi par le genre *Aspergillus* avec 35 % et enfin *Penicillium* avec un pourcentage de 5%. En ce qui concerne l'échantillon altéré, nous avons identifié trois genres différents avec une prévalence du genre *Rhizopus* avec 47 % et les genres *Alternaria* et *Aspergillus* avec 26 % chacun.

Tableau 21. Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété MBB

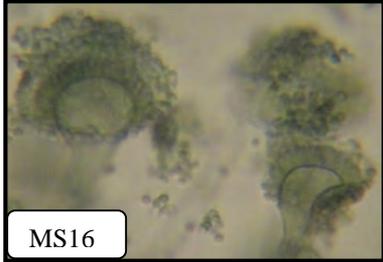
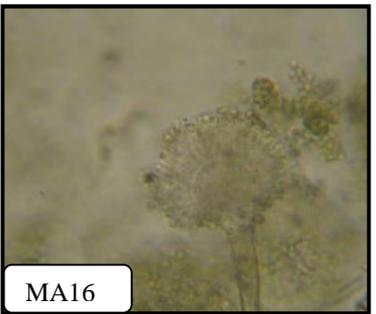
| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|--------------------------------|---|---|---|
| Echantillon : « grains sains » | MS1 MS15 MS17 MS3 MS4 MS5 MS6 MS8 MS12 MS9 MS10 MS13 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, fines et régulières, de couleur brun foncé à noir. • Des conidies pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (Dictyospores) en chaînes. Les conidies sont de forme irrégulière, se présentant le plus souvent avec un ressort apical court bien différencié. | <p><i>Alternaria</i></p>  <p>MS13</p> <p>X 40</p> |
| | MS7 MS11 MS14 MS16 MS18 MS19 MS20 | <ul style="list-style-type: none"> • Les mycéliums sont septés et ramifiés. • Les conidiophores se terminant par une vésicule de forme subglobuleuse sur laquelle sont disposées les phialides. • La tête conidienne rayonnante, unisériée. | <p><i>Aspergillus</i></p>  <p>MS16</p> <p>X 40</p> |
| | MS2 | <ul style="list-style-type: none"> • Les mycéliums septés et ramifiés. • Le conidiophore verticillé et irrégulièrement ramifié avec des métules portant les phialides, les conidies formées à partir de ces phialides. • Les conidies de forme ovale. Elles forment des chaînes irrégulières | <p><i>Penicillium</i></p>  <p>MS2</p> <p>X 100</p> |

Tableau 22. Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété MBB

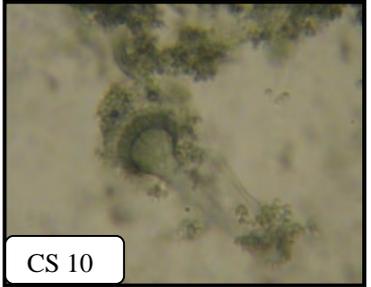
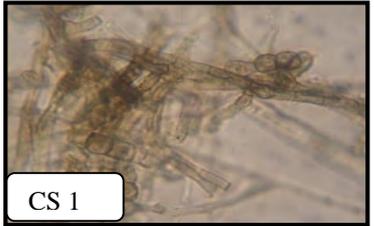
| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|----------------------------------|---|--|---|
| Echantillon : « grains altérés » | MA4 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle non cloisonné avec ramifications. • Les sporocystophores disposés en bouquet à la base de rhizoïdes, et se terminent par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste. • les spores grises de forme sphérique. |  <p>MA9</p> <p>X 40</p> |
| | MA6 | | |
| | MA7 | | |
| | MA8 | | |
| | MA9 | | |
| | MA10 | | |
| | MA13 | | |
| | MA18 | | |
| | MA19 | | |
| | MA20 | | |
| | MA22 | | |
| | MA1 | | |
| MA2 | | | |
| MA3 | | | |
| MA5 | | | |
| MA11 | | | |
| MA14 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, sur lesquelles prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés • Le conidiophore renflé en une vésicule de forme globuleuse à subglobuleuse. • Les phialides insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées). Les têtes conidiennes rayonnantes issues du bourgeonnement de l'extrémité de la phialide. Les conidies globuleuses. | <i>Aspergillus</i> |  <p>MA16</p> <p>X 40</p> |
| MA12 | | | |
| MA15 | | | |
| MA16 | | | |
| MA17 | | | |
| MA21 | | | |
| MA23 | | | |

III.2.2.2.2. Variété CIRTA

Quatre genres différents ont été révélés à partir des souches isolées des échantillons analysés de la variété CIRTA. Ces genres sont: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Aureobasidium* (Tableaux 23 et 24). Pour l'échantillon sain, nous avons isolé des souches appartenant à quatre genres dont le genre majoritaire est *Alternaria* avec un pourcentage de 44%, suivi par le genre *Rhizopus* avec un pourcentage de 27 %, puis les genres : *Aspergillus* avec 22% et *Aureobasidium* avec 5%. Quant à l'échantillon altéré, nous avons isolé des souches appartenant à trois

genres identifiés : le genre majoritaire est *Alternaria* avec un pourcentage de 60 %, suivi par le genre *Aspergillus* avec un pourcentage 30 %, puis le genre *Rhizopus* avec 10 %.

Tableau 23. Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété CIRTA

| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|------------------|--|---------------------------|---|
| CS 2 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications fines et régulières, de couleur brun foncé à noir. • Des conidies dictyospores disposées en chaînes. • Les conidies de forme irrégulière, se présentant le plus souvent avec un ressort apical court bien différencié. | <i>Alternaria</i> |  <p>CS 4</p> <p>X 40</p> |
| CS 3 | | | |
| CS 4 | | | |
| CS 5 | | | |
| CS 6 | | | |
| CS 7 | | | |
| CS 14 | | | |
| CS 18 | | | |
| CS 13 | <ul style="list-style-type: none"> • Le mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule de forme subglobuleuse. Les phialides insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) • Les conidies ont une forme globuleuse et de couleur vert foncé. | <i>Aspergillus</i> |  <p>CS 10</p> <p>X 40</p> |
| CS 15 | | | |
| CS 16 | | | |
| CS 17 | | | |
| CS 8 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle non cloisonné avec ramifications. • Les sporocystophores disposés en bouquet à la base de rhizoïdes, et se terminant par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste. • les spores grises avec des formes sphériques. | <i>Rhizopus</i> |  <p>CS 9</p> <p>X 10</p> |
| CS 9 | | | |
| CS 10 | | | |
| CS 11 | | | |
| CS 12 | | | |
| CS 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Mycélium septé et ramifié. • Des arthrospores foncées produites simultanément (synchrones) et directement sur les filaments végétatifs, situées le long des hyphes. | <i>Aureobasidium</i> |  <p>CS 1</p> <p>X 40</p> |

Echantillon : « grains sains »

Tableau 24. Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété CIRTA

| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique | | |
|----------------------------------|--|--|---|--|---|
| Echantillon : « grains altérés » | CA 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle non cloisonné avec ramifications. • Les sporocystophores disposés en bouquet à la base de rhizoïdes, et se terminant par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste. • Les spores grises de forme sphérique. |  <p>CA 1</p> <p>X 10</p> | | |
| | CA 2 | | | | |
| | CA 3 | | | | |
| | CA 4 | | | | |
| | CA 5 | | | | |
| | CA 6 | | | | |
| | CA 7 | | | | |
| | CA 9 | | | | |
| | CA 10 | | | | |
| | CA 12 | | | | |
| | CA 13 | | | | |
| | CA 14 | | | | |
| | CA 11 | | | <ul style="list-style-type: none"> • Le mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule de forme globuleuse à subglobuleuse. Les phialides insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées). • Les conidies ont une forme globuleuse et de couleur vert foncé. |  <p>CA 18</p> <p>X 40</p> |
| | CA 15 | | | | |
| CA 16 | | | | | |
| CA 18 | | | | | |
| CA 19 | | | | | |
| CA 8 | | | | | |
| CA 20 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications fines et régulières, de couleur brun foncé à noir. • Des conidies dictyospores disposées en chaînes. • Les conidies de forme irrégulière, se présentant le plus souvent avec un ressort apical court bien différencié. |  <p>CA 20</p> <p>X 40</p> | | | |
| CA 17 | | | | | |

III.2.2.2.3. Variété VITRON

Six genres différents ont été identifiés à partir des souches isolées des échantillons analysés de la variété VITRON. Ces genres sont: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Bipolaris* et *Fusarium* (Tableaux 25 et 26). Sur l'échantillon sain, nous avons isolé des souches appartenant à trois genres dont le genre majoritaire est *Alternaria* avec un pourcentage de 88%, puis les genres : *Aspergillus* et *Aureobasidium* avec 5 % chacun. En ce qui concerne l'échantillon altéré, nous avons isolé des souches appartenant à quatre genres : le genre prévalent est *Alternaria*

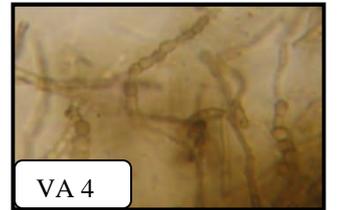
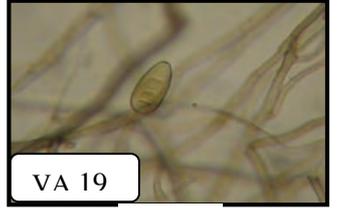
avec un pourcentage de 70 %, suivi par le genre *Rhizopus* avec un pourcentage de 20 %, puis les genres *Aspergillus* et *Bipolaris* avec un pourcentage de 10% chacun.

Tableau 25. Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété VITRON

| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|------------------|--|---------------------------|---|
| VS 3 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, fines et régulières, de couleur brun foncé à noir. • Les conidies, de forme dictyospores, brunes, disposées en chaîne acropète, d'aspects piriforme ou ovoïde, à base élargie avec des septations transversales, longitudinales, obliques en nombre variable. Elles présentent à l'autre extrémité une partie plus rétrécie, plus ou moins longue appelée bec. | <i>Alternaria</i> |  <p>VS 5</p> <p>X 40</p> |
| VS 4 | | | |
| VS 5 | | | |
| VS 6 | | | |
| VS 7 | | | |
| VS 8 | | | |
| VS 9 | | | |
| VS 10 | | | |
| VS 11 | | | |
| VS 12 | | | |
| VS 14 | | | |
| VS 15 | | | |
| VS 16 | | | |
| VS 17 | | | |
| VS 1 | | | |
| VS 13 | <ul style="list-style-type: none"> • Les conidiophores ramifiés, portent des masses de macroconidies. • Les macroconidies fusiformes, courbées, avec des cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. | <i>Fusarium</i> |  <p>VS 13</p> <p>X 100</p> |
| VS 2 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, sur lesquelles prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés, conidiophores. • Le conidiophore s'élargit progressivement vers le haut pour former une vésicule. • Les vésicules globuleuses. Les phialides, portées directement sur la vésicule (unisériées) et disposées en rayons couvrant entièrement la vésicule. • Les conidies presque rondes, en chaînes radiales. | <i>Aspergillus</i> |  <p>VS 2</p> <p>X 40</p> |

Echantillon : « grains sains »

Tableau26. Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété VITRON

| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|----------------------------------|---|---|---|
| Echantillon : « grains altérés » | VA 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, fines et régulières, de couleur brun foncé à noir. • Les conidies de forme dictyospores, brunes, disposées en chaîne acropète, d'aspects piriforme ou ovoïde, à base élargie avec des septations transversales, longitudinales, obliques en nombre variable. Elles présentent à l'autre extrémité une partie plus rétrécie, plus ou moins longue appelée bec. |  <p>VA 2</p> <p>X 40</p> |
| | VA 2 | | |
| | VA 3 | | |
| | VA 5 | | |
| | VA 6 | | |
| | VA 7 | | |
| | VA 8 | | |
| | VA 9 | | |
| | VA 10 | | |
| | VA 11 | | |
| | VA 12 | | |
| | VA 13 | | |
| | VA 18 | | |
| VA 20 | | | |
| VA 14 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle non cloisonné avec ramifications. • Les sporocystophores disposés en bouquet à la base de rhizoïdes, se terminant par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste. • Les spores grises de forme sphérique. |  <p>VA 17</p> <p>X 40</p> | |
| VA 15 | | | |
| VA 16 | | | |
| VA 17 | | | |
| VA 4 | <ul style="list-style-type: none"> • Mycélium septé et ramifié. • Des arthrospores foncées produites simultanément (synchrones) et directement sur les filaments végétatifs, situées le long des hyphes. |  <p>VA 4</p> <p>X 40</p> | |
| VA 19 | <ul style="list-style-type: none"> • Mycélium septé, de couleur brun. • Les conidies droites, elliptiques, souvent cylindriques, arrondies à leur base, de couleur brune, et possédant plusieurs cloisons. |  <p>VA 19</p> <p>X 40</p> | |

III.2. 2.2.4. Variété SEMITO

Cinq différents genres ont été mis en évidence à partir des souches isolées des échantillons analysés de la variété SEMITO. Ces genres sont: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Bipolaris* et *Fusarium* (Tableaux 27 et 28). Sur l'échantillon sain, nous avons isolé des souches appartenant à quatre genres dont le genre majoritaire est *Alternaria* avec un pourcentage de 58%, suivi par le

genre *Aureobasidium* avec un pourcentage de 23 %, puis les genres *Rhizopus* avec 11% et *Fusarium* avec 5%. A propos de l'échantillon altéré, nous avons isolé des souches appartenant à quatre genres dont deux genres sont majoritaires et qui sont *Alternaria* et *Rhizopus* avec un pourcentage de 45 % chacun, puis les genres *Aureobasidium* et *Bipolaris* avec 4% chacun.

Tableau 27. Caractères microscopiques des souches isolées des grains sains de la variété SIMETO

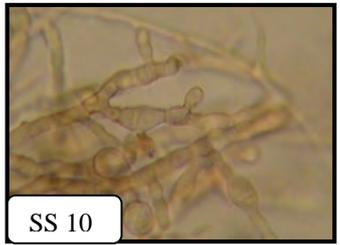
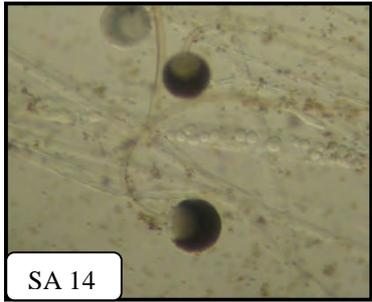
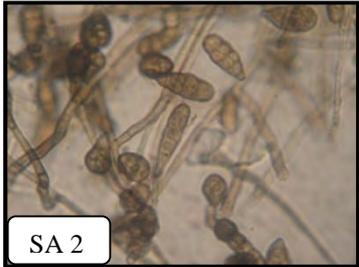
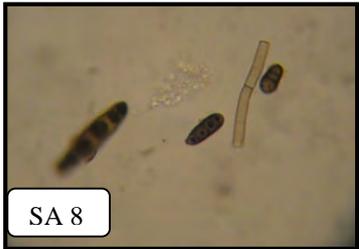
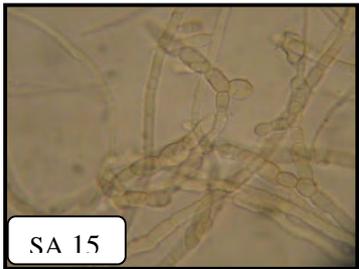
| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|--------------------------------|--|---|---|
| Echantillon : « grains sains » | SS 3 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, fins et réguliers, brun foncé à noir. • Les conidiophores avec de grandes conidies simples et ramifiées, ovoïdes et ellipsoïdes, segmentées par des cloisons transversales et longitudinales. L'extrémité de la conidie située près du conidiophore est arrondie, tandis que l'extrémité située près de l'apex est effilée, conférant aux conidies leur aspect typique de massue. |  <p>SS 9</p> <p>X 40</p> |
| | SS 5 | | |
| | SS 7 | | |
| | SS 8 | | |
| | SS 9 | | |
| | SS 11 | | |
| | SS 12 | | |
| | SS 13 | | |
| | SS 15 | | |
| | SS 2 | | |
| SS 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Mycélium septé et ramifié. • Des arthrospores foncées produites simultanément (synchrones) et directement sur les filaments végétatifs, situées le long des hyphes. |  <p>SS 10</p> <p>X 40</p> | |
| SS 10 | | | |
| SS 16 | | | |
| SS 17 | | | |
| SS 4 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle non cloisonné avec ramifications. • Les sporocystophores disposés en bouquet à la base de rhizoïdes, et se terminant par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste. • Les spores grises avec des formes sphériques. |  <p>M4</p> <p>X 40</p> | |
| SS 6 | | | |
| SS 14 | <ul style="list-style-type: none"> • Les conidiophores ramifiés, portent des masses de macroconidies. • Les macroconidies fusiformes, courbées, et présentant des cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. |  <p>SS 14</p> <p>X 100</p> | |

Tableau28. Caractères microscopiques des souches isolées des grains altérés de la variété SIMETO

| Code des souches | Mycéliums, conidiophores et conidies | Identification des genres | Quelques exemples d'observation microscopique |
|----------------------------------|---|--|--|
| Echantillon : « grains altérés » | SA 12 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle non cloisonné avec ramifications. • Les sporocystophores disposés en bouquet à la base de rhizoïdes, et se terminant par une columelle autour de laquelle se différencient les spores dans un sporocyste. • Les spores grises avec des formes sphériques. |  <p>SA 14</p> <p>X 10</p> |
| | SA 13 | | |
| | SA 16 | | |
| | SA 17 | | |
| | SA 18 | | |
| | SA 19 | | |
| | SA 20 | | |
| | SA 21 | | |
| | SA 22 | | |
| | SA 23 | | |
| | SA 14 | | |
| SA 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Thalle cloisonné avec ramifications, fines et régulières, brun foncé à noir. • Les conidiophores avec de grandes conidies simples et ramifiées, ovoïdes et ellipsoïdes, segmentées par des cloisons transversales et longitudinales. L'extrémité de la conidie située près du conidiophore est arrondie, tandis que l'extrémité située près de l'apex est effilée, conférant aux conidies leur aspect typique de massue. |  <p>SA 2</p> <p>X 40</p> | |
| SA 2 | | | |
| SA 4 | | | |
| SA 5 | | | |
| SA 7 | | | |
| SA 9 | | | |
| SA 10 | | | |
| SA 3 | | | |
| SA 11 | | | |
| SA 14 | | | |
| SA 6 | | | |
| SA 8 | <ul style="list-style-type: none"> • Mycélium septé, de couleur brun. • Les conidies droites, elliptiques, souvent cylindriques, arrondies à leur base, de couleur brune, et possédant plusieurs cloisons. |  <p>SA 8</p> <p>X 40</p> | |
| SA 15 | <ul style="list-style-type: none"> • Mycélium septé et ramifié. • Des arthrospores foncées produites simultanément (synchrones) et directement sur les filaments végétatifs, situées le long des hyphes. |  <p>SA 15</p> <p>X 40</p> | |

III.3. Effet antifongique des extraits polyphénoliques

Les résultats de l'activité antifongique des extraits polyphénoliques *in vitro* ont montré une inhibition de la croissance des mycéliums mais de façon différente. Les extraits polyphénoliques n'ont pas le même pourcentage d'inhibition à la même concentration vis-à-vis des souches testées. Nous avons constaté, d'une manière générale, que le pourcentage d'inhibition des extraits polyphénoliques des échantillons sains est supérieur à celui des extraits polyphénoliques des échantillons altérés vis à vis de la même souche.

III.3.1. Souche *Alternaria sp.*

D'après la figure 13, la croissance du mycélium de la souche *Alternaria sp.* a été inhibée efficacement par les extraits polyphénoliques. Par ailleurs, pour la même concentration, les différents extraits polyphénoliques n'ont pas le même pourcentage d'inhibition vis-à-vis de la même souche testée. Les pourcentages d'inhibition, à 40 mg.ml⁻¹ des extraits polyphénoliques ayant pour origine les grains sains, sont plus élevés chez les variétés MBB (88.86 %) et CIRTA (81.17 %) que chez les variétés VITRON (70.60 %) et SIMETO (77.65 %). Alors que pour les extraits polyphénoliques ayant pour origine les grains altérés, les pourcentages d'inhibition sont plus élevés chez les variétés MBB (73.68 %) et SIMETO (73.53 %) que chez les variétés VITRON (70.00 %) et CIRTA (70.00%) (Annexe IV).

Nous avons constaté aussi, d'une manière générale, que le pourcentage d'inhibition est plus élevé avec les extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains que ceux des échantillons altérés pour la même concentration.

Le tableau 29 représente les concentrations réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne. La plus faible et la plus intéressante CI50 est constatée chez l'extrait polyphénolique ayant pour origine l'échantillon sain de la variété SIMETO, par contre la plus forte et la moins intéressante est observée chez l'extrait polyphénolique provenant de l'échantillon altéré de la variété VITRON.

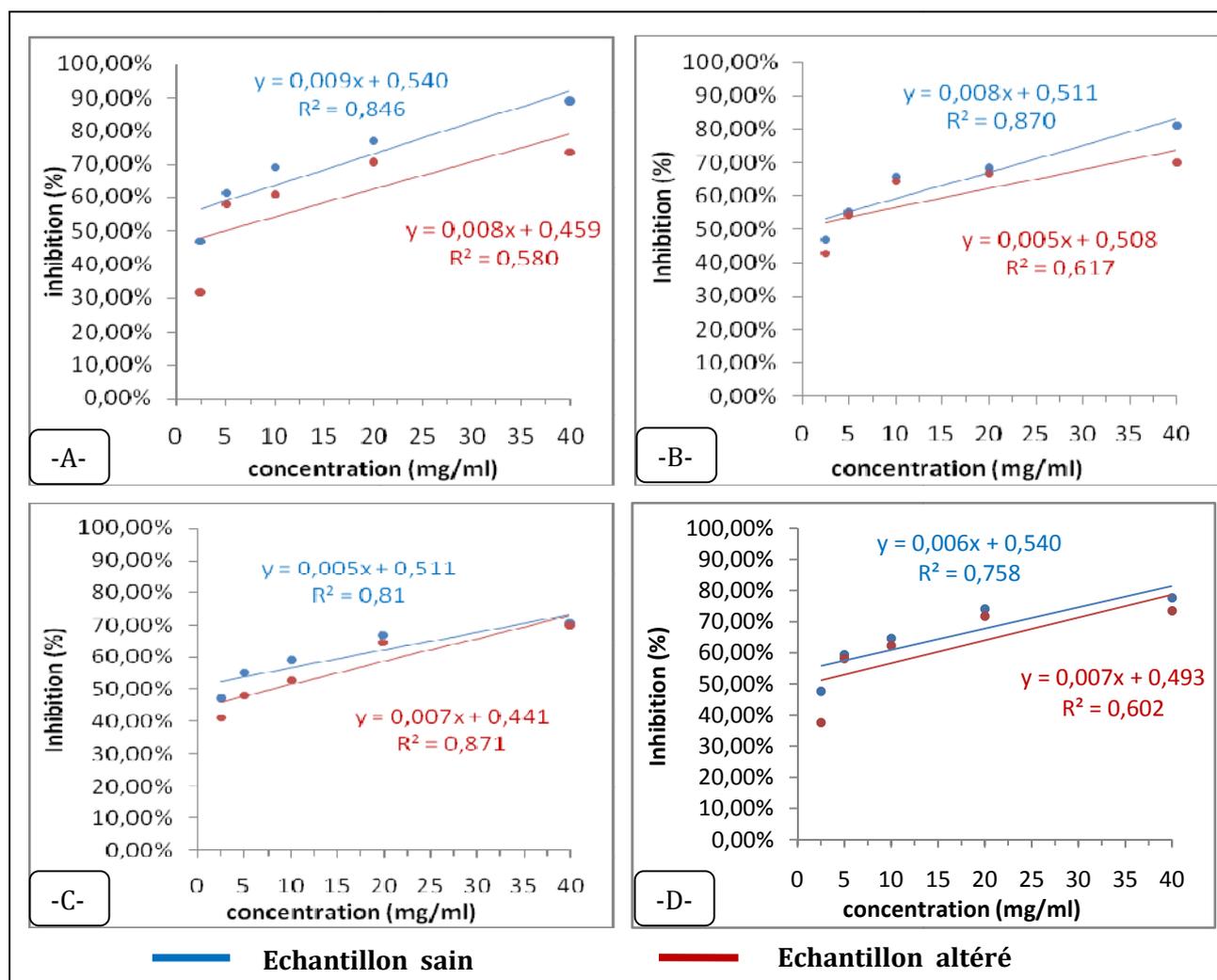


Figure 13. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche *Alternaria sp.*: (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SEMITO.

Tableau 29. Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche *Alternaria sp.*

| | MBB | | CIRTA | | VITRON | | SIMETO | |
|---------------------------------|------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| mg/ml d'extrait sec | 2.70 | 5.38 | 3.17 | 3.71 | 3.21 | 6.17 | 2.59 | 4.21 |
| µg EAG/ml de polyphénols totaux | 5.13 | 8.44 | 5.43 | 5.65 | 5.93 | 10.47 | 4.87 | 7.08 |

III.3.2. Souche *Rhizopus sp.*

Concernant la souche *Rhizopus sp.*, la figure 14 montre que la croissance mycélienne a été inhibée d'une manière efficace mais différemment par les extraits polyphénoliques. Il est à observer que pour la même concentration, les différents extraits polyphénoliques n'ont pas le même pourcentage d'inhibition vis-à-vis de la même souche testée. Les pourcentages d'inhibition, à

40mg.ml⁻¹ d'extrait polyphénolique ayant pour origine les grains sains, sont plus élevés chez les variétés MBB (79,41%) et SIMETO (84,12%) que chez les variétés CIRTA (72,94%) et VITRON (71,76%). Pour les extraits polyphénoliques provenant des grains altérés, il a été constaté que les pourcentages d'inhibition, à 40 mg.ml⁻¹ sont plus élevés chez les variétés SIMETO (81,17%) et CIRTA (69,41%) que chez les variétés MBB (56,47%) et VITRON (63,53%). Nous avons aussi constaté, d'une manière générale, que les pourcentages d'inhibition sont plus élevés chez les extraits polyphénoliques des échantillons sains que ceux des échantillons altérés pour la même concentration (Annexe IV).

Le tableau 30 présente les concentrations réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne. La plus faible et la plus intéressante CI50 est constatée avec l'extrait polyphénolique ayant pour origine l'échantillon sain de la variété SIMETO, par contre la plus forte et la moins intéressante est observée avec l'extrait polyphénolique provenant de l'échantillon altéré de la variété MBB.

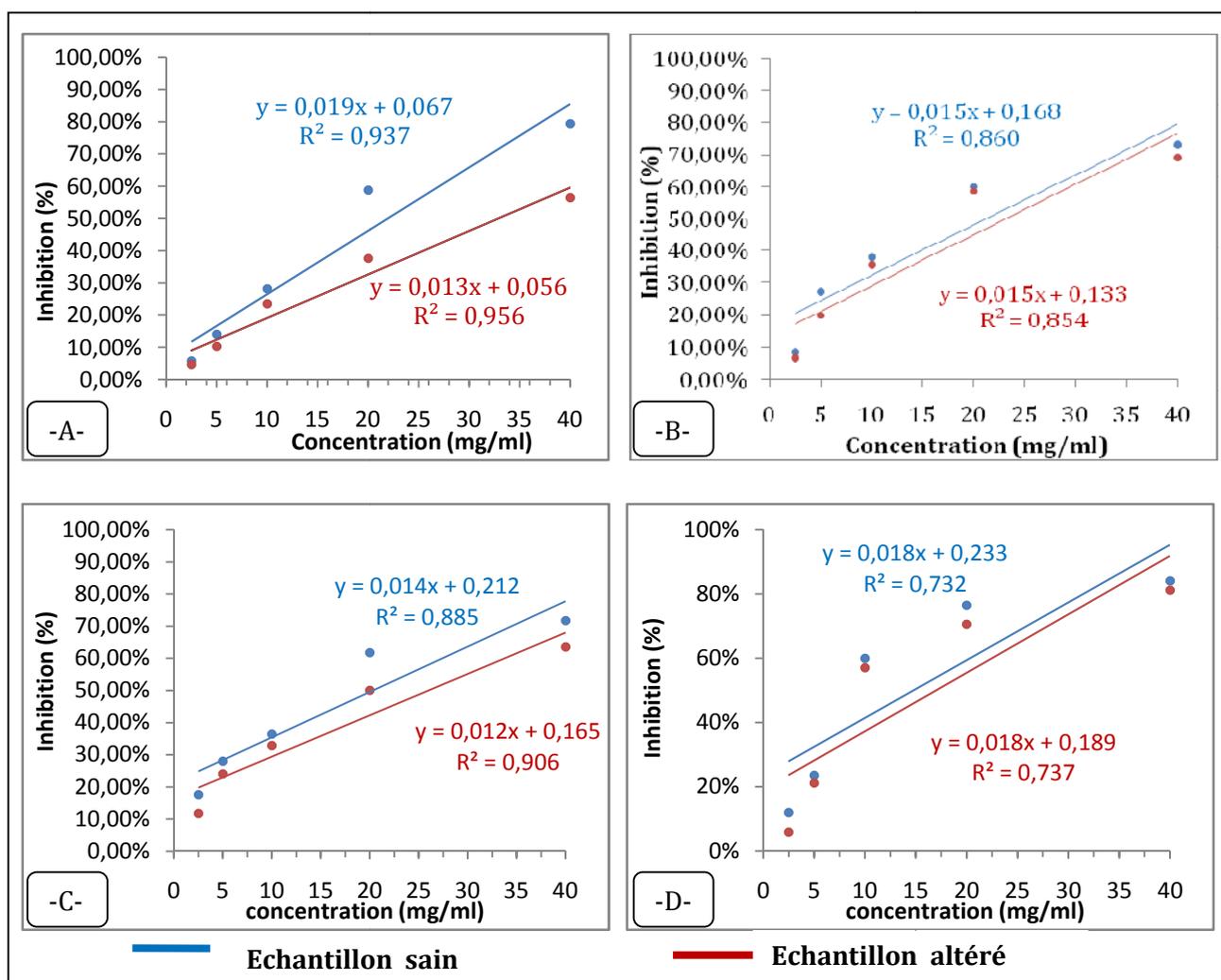


Figure 14. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche *Rhizopus sp.* : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO.

Tableau 30. Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche *Rhizopus sp.*

| | MBB | | CIRTA | | VITRON | | SIMETO | |
|------------------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| mg/ml d'extrait sec | 22.79 | 34.15 | 22.13 | 24.46 | 20.57 | 27.91 | 14.83 | 17.27 |
| µg EAG/ml de polyphénols totaux | 43.30 | 53.54 | 37.90 | 36.69 | 38.03 | 47.39 | 27.88 | 29.06 |

III.3.3. Souche *Aureobasidium sp.*

Pour l'ensemble des extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains (Figure 15), nous remarquons que l'extrait polyphénolique provenant de la variété CIRTA, à une concentration équivalente à 40 mg.ml⁻¹, montre une activité inhibitrice de la croissance plus élevée sur la souche *Aureobasidium sp.*(76,71%) par comparaison aux variétés : MBB (53,49%) et VITRON (57,33%). Quant à l'extrait polyphénolique provenant de l'échantillon sain de la variété SIMETO, nous remarquons qu'il n'a même pas atteint la concentration réduisant 50 % (CI50) de la croissance mycélienne, cette dernière vaut 48,46% et elle a été estimée statistiquement par l'équation de régression de courbe de tendance linéaire. De la même manière et par comparaison aux extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains, les extraits polyphénoliques provenant des échantillons altérés ont présenté une activité inhibitrice de la croissance moins intéressante (Annexe IV).

Le tableau 31 présente les concentrations réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne. La plus faible et la plus intéressante CI50 est constatée chez l'extrait polyphénolique ayant pour origine l'échantillon sain de la variété CIRTA, par contre la plus forte et la moins intéressante est observée avec l'extrait polyphénolique provenant de l'échantillon altéré de la variété SIMETO.

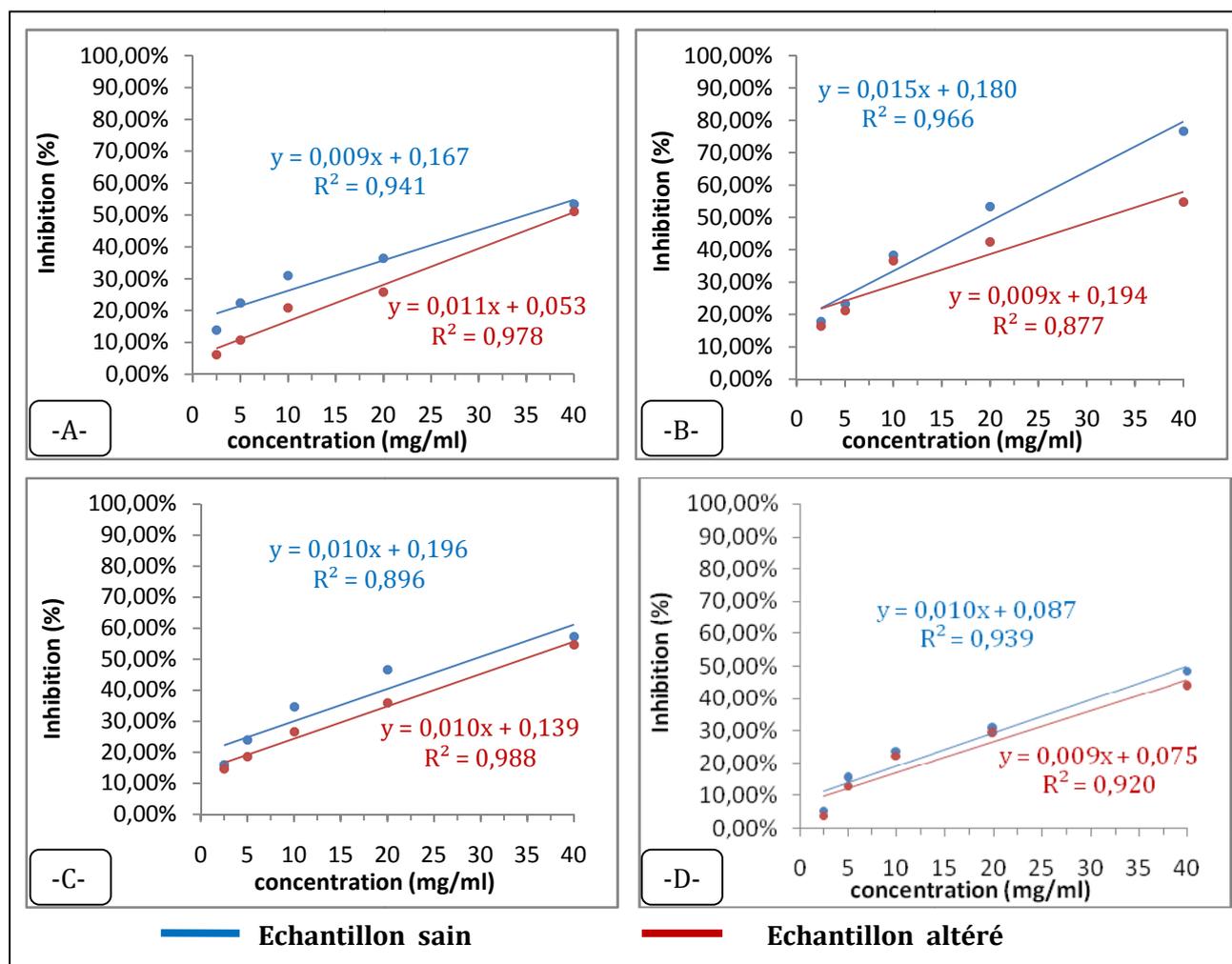


Figure 15. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche *Aureobasidium sp.* : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SIMETO.

Tableau 31. Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche *Aureobasidium sp.*

| | MBB | | CIRTA | | VITRON | | SIMETO | |
|---------------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| mg/ml d'extrait sec | 37.00 | 40.63 | 21.33 | 34.00 | 30.40 | 36.10 | 41.30 | 47.22 |
| µg EAG/ml de polyphénols totaux | 70.30 | 63.70 | 36.53 | 51.00 | 56.21 | 61.29 | 77.64 | 79.47 |

III.3.4. Souche *Bipolaris sp.*

Les extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains des variétés MBB et CIRTA, à une concentration équivalente à 40 mg.ml⁻¹, ont présenté une activité antifongique inhibitrice relativement plus élevée par comparaison aux extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains des variétés VITRON et SIMETO (Figure 16). En parallèle, nous avons constaté que les

pourcentages d'inhibition sont plus élevés avec les échantillons sains que pour ceux provenant des échantillons altérés pour la même concentration. Le tableau 32 présente les concentrations réduisant 50 % la croissance mycélienne. La plus faible et la plus intéressante CI50 est constatée avec l'extrait polyphénolique ayant pour origine l'échantillon sain de la variété MBB (29.45%), par contre la plus forte et la moins intéressante est observée avec l'extrait polyphénolique provenant de l'échantillon altéré de la variété CIRTA (62.72%) (Annexe IV).

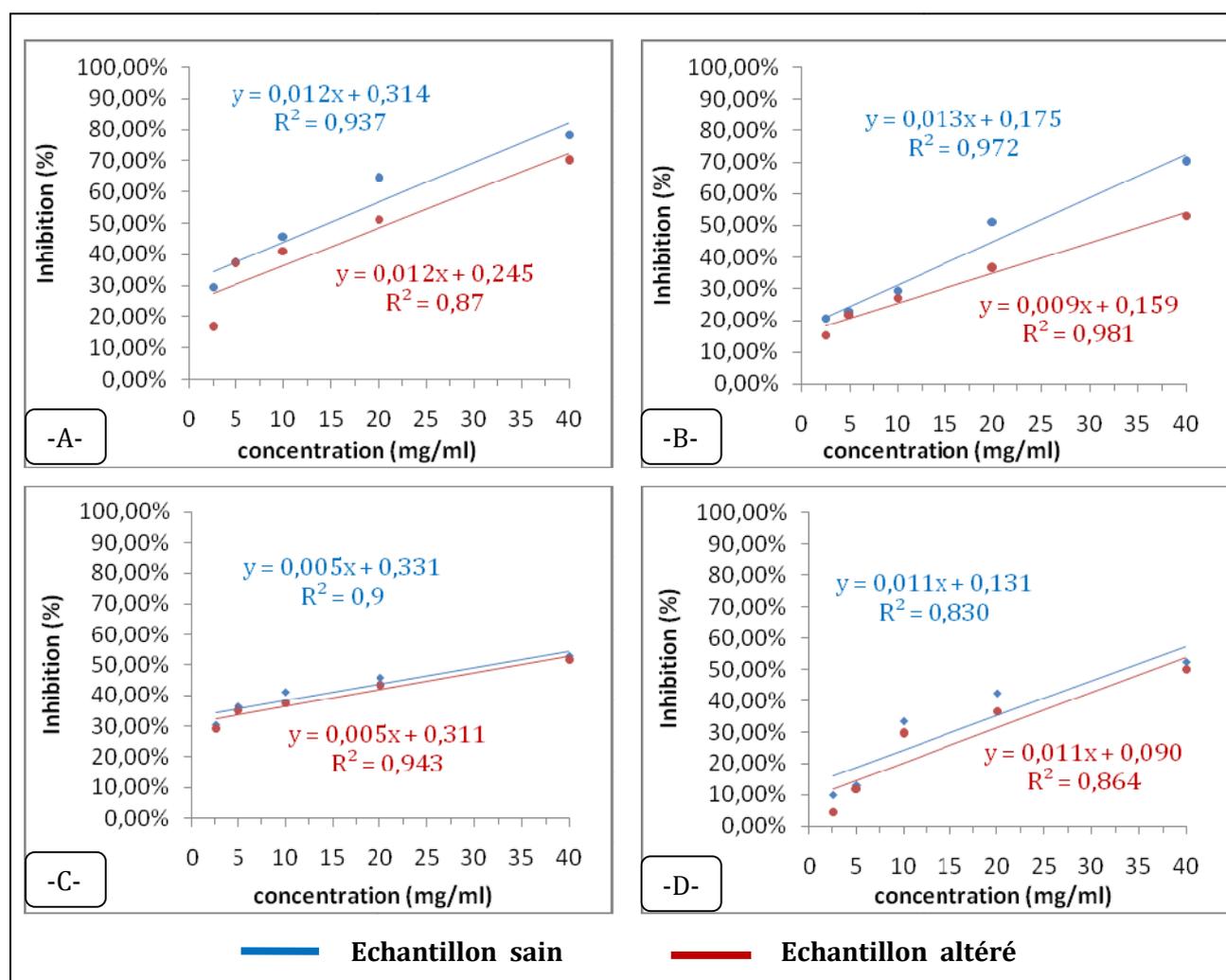


Figure 16. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche *Bipolaris sp.* : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SEMITO.

Tableau 32. Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche *Bipolaris sp.*

| | MBB | | CIRTA | | VITRON | | SIMETO | |
|---------------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| mg/ml d'extrait sec | 15.50 | 21.25 | 25.00 | 37.88 | 33.80 | 37.80 | 33.54 | 37.27 |
| µg EAG/ml de polyphénols totaux | 29.45 | 33.32 | 42.82 | 56.82 | 62.49 | 64.18 | 63.05 | 62.72 |

III.3.5. Souche *Fusarium sp.*

En ce qui concerne la souche *Fusarium sp.*, les pourcentages d'inhibition des extraits polyphénoliques des variétés analysées (Figure 17), à 40 mg.ml⁻¹ d'extrait polyphénolique, sont moins importants par comparaison aux souches testées précédemment. Par ailleurs, les extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains des variétés MBB et SEMITO ont présenté des pourcentages d'inhibition intéressants et valent respectivement 64,56 % et 60% à une concentration équivalente à 40 mg/ml, alors que les extraits polyphénoliques provenant toujours d'échantillons sains des variétés CIRTA et VITRON n'ont pas atteint la concentration réduisant 50 % la croissance mycélienne et valent respectivement 48,66% et 46,66% (Annexe IV).

De la même manière que précédemment et par comparaison aux extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains, les extraits polyphénoliques provenant des échantillons altérés ont présenté une activité inhibitrice de la croissance moins intéressante.

Le tableau 33 présente les concentrations réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne. La plus faible et la plus intéressante CI50 est constatée chez l'extrait polyphénolique ayant pour origine l'échantillon altéré de la variété MBB, par contre la plus forte et la moins intéressante est observée avec l'extrait polyphénolique provenant de l'échantillon altéré de la variété VITRON.

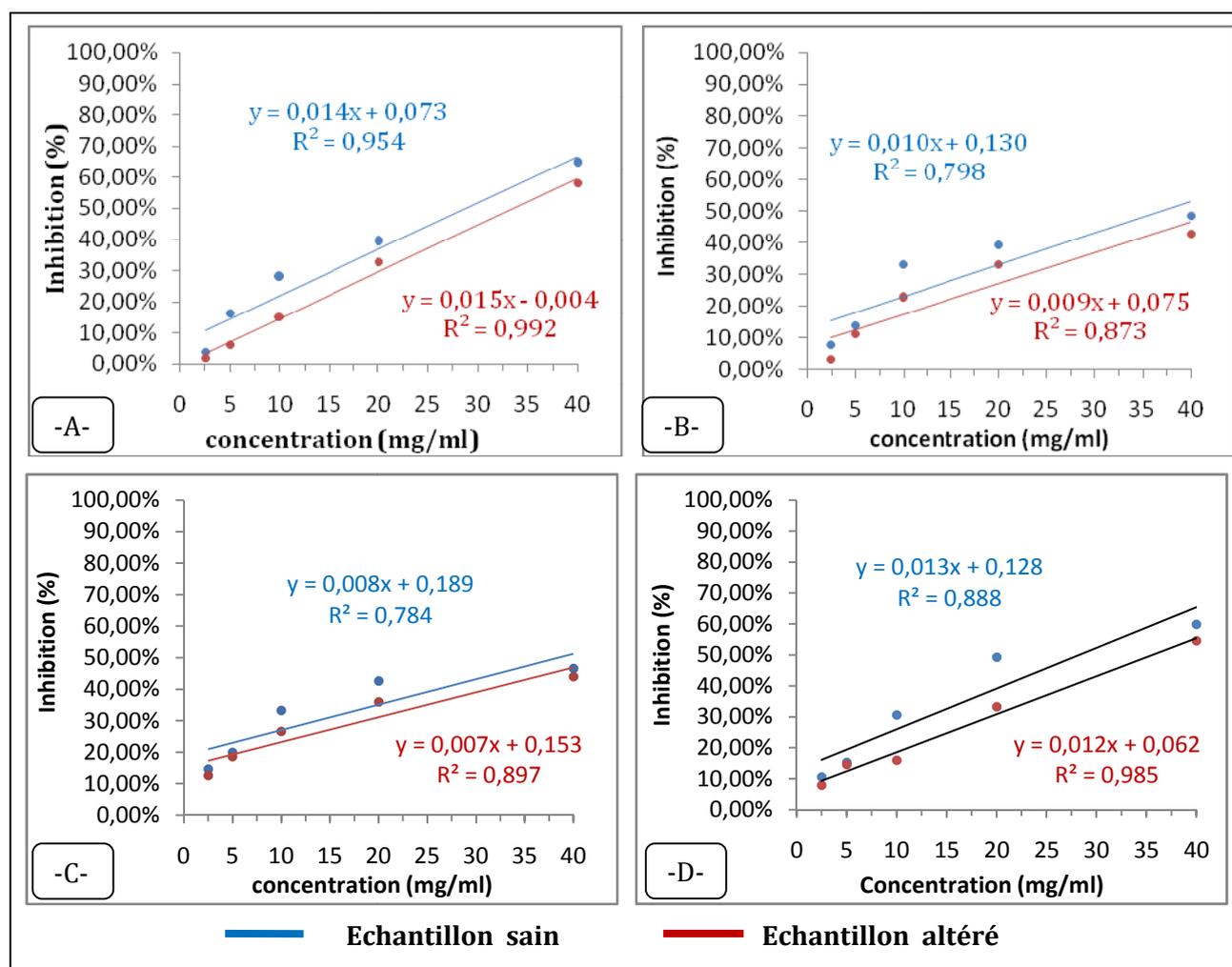


Figure 17. Effet antifongique des extraits polyphénoliques secs à différentes concentrations des échantillons sains et altérés sur la croissance du mycélium de la souche *Fusarium sp.* : (A) MBB, (B) CIRTA, (C) VITRON et (D) SEMITO.

Tableau 33. Concentration des polyphénols totaux réduisant 50 % (CI50) la croissance mycélienne de la souche *Fusarium sp.*

| | MBB | | CIRTA | | VITRON | | SIMETO | |
|---------------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré | sain | altéré |
| mg/ml d'extrait sec | 30.50 | 33.60 | 37.00 | 47.22 | 38.87 | 49.57 | 28.61 | 36.50 |
| µg EAG/ml de polyphénols totaux | 57.95 | 52.68 | 63.38 | 70.83 | 71.87 | 84.17 | 53.78 | 61.43 |

III.3.6. Souches *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*

Concernant les souches d'*Aspergillus sp.* Et de *Penicillium sp.*, les extraits polyphénoliques ont présenté un effet inhibiteur (Annexe IV), mais nous n'avons pas pu évaluer cet effet à cause de la dispersion des colonies sur toute la boîte de Pétri.

III.4. Test de corrélations

Le but du test de corrélations est de mettre en évidence la présence ou non de corrélations entre les différents paramètres étudiés qui sont : le taux d'extrait sec, la teneur en polyphénols totaux, l'humidité et le pourcentage de contamination.

Le test de corrélation montre que certains paramètres sont corrélés entre eux (Tableau 34). Une corrélation hautement et négativement significative ($r = -0,818$) est observée entre la teneur en polyphénols totaux et le pourcentage de contamination. Une autre corrélation hautement, mais positivement, significative ($r = 0,779$) entre la teneur en polyphénols totaux et le taux d'extrait polyphénolique sec. Parmi les corrélations moyennement significatives, une corrélation positive ($r = 0,543$) a été observée entre le taux d'humidité et le pourcentage de contamination et une corrélation négative ($r = -0,475$) a été observée entre le pourcentage de contamination et l'extrait sec.

Tableau 34. Matrice de corrélation (Pearson (n)) entre les différents paramètres analysés : le taux d'extrait sec, la teneur en polyphénols totaux, l'humidité et le pourcentage de contamination et la quantité des extraits polyphénoliques secs

| Variables | PC | TH | TPT | ES |
|-----------|----|--------|----------|---------|
| PC | 1 | 0,543* | -0,818** | -0,475* |
| TH | | 1 | -0,188 | -0,054 |
| TPT | | | 1 | 0,779** |
| ES | | | | 1 |

PC : Pourcentage de contamination ; **TH** : Taux d'humidité ; **TPT** : Teneur en polyphénols totaux ; **ES** : Extrait polyphénolique sec ; ** : hautement significative ; * : moyennement significative

Le taux d'humidité des échantillons analysés varie de 10,40 à 12,51 %. Par comparaison à la norme (9% à 13%) citée par Boudreau et Ménard (1992) et la norme (maximum 14.5%) du CODEX STAN 199-1995, les valeurs trouvées ne semblent pas être réellement favorables pour le développement des moisissures si on tient compte seulement de ce facteur. Ce constat est valable pour tous les échantillons où l'analyse de la variance n'a montré aucune différence significative ($p \leq 0.05$) sur les plans intra et inter-variétal.

Quant à la teneur en polyphénols totaux, elle a été exprimée en termes d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec et a été évaluée par le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette évaluation nous a permis d'avoir une idée sur les variations quantitatives des polyphénols totaux sur les plans inter-variétal (entre variétés) et intra-variétal (entre les échantillons sain et altéré de la même variété). En effet, les céréales et y compris le blé sont considérés comme des produits particulièrement riches en polyphénols notamment en acides phénoliques (Slavin *et al.*, 1999). Les teneurs en polyphénols totaux enregistrées varient de 1.606 à 1.781 mg EAG/g d'extrait sec. Par comparaison aux teneurs en polyphénols totaux citées par Mpofo *et al.* (2006), variant entre 1,709 et 1,990mgEAG /g, et celles citées par Masum Akond *et al.* (2010) oscillant entre 1.269 et 1.316 mg EAG/g de grain de blé entier, les valeurs trouvées sont nettement supérieures à celles de Masum Akond *et al.* (2010) et sont proches de celles de Mpofo *et al.* (2006).

A l'échelle variétale, les résultats obtenus indiquent que la plus forte teneur en polyphénols totaux a été constatée dans l'extrait de la variété SIMETO, et la plus faible chez la variété CIRTA; Ces teneurs sont équivalentes respectivement à $1,781 \pm 0,065$ et $1,606 \pm 0,085$ mg EAG /g d'extrait sec des grains entiers broyés. De même, l'analyse de la variance a montré une différence significative ($p \leq 0.05$) entre la variété VITRON et les variétés SIMETO et CIRTA. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs parmi lesquels figurent les facteurs cultureux comme le climat et les conditions de culture (fertilisation) et les facteurs intrinsèques de la variété notamment le génotype, le mécanisme de défense et la résistance variétale (Benbrook, 2005 ; Beta *et al.*, 2005 ; Mursu, 2007).

En se référant à la bibliographie, très peu de travaux de recherche ont cherché à corréler la teneur en polyphénols totaux avec la résistance à l'infestation fongique des grains durant le stockage; ce qui nous a orienté parfois vers une comparaison de nos résultats avec ceux constatés au stade végétatif.

A l'échelle intra-variétale, malgré l'absence quelques fois de différence significative, nous avons constaté que les échantillons sains présentent des teneurs plus élevées en polyphénols totaux par rapport aux échantillons altérés pour toutes les variétés analysées. Si on considère que les échantillons sains sont des génotypes résistants et que les échantillons altérés sont des génotypes sensibles aux maladies fongiques, ce constat concorde avec les résultats de certains travaux notamment ceux de Dubin et Bimb (1991) et Patil *et al.* (2011) qui ont signalé que la concentration des polyphénols totaux est généralement plus élevée chez les génotypes résistants de blé que chez les génotypes sensibles aux maladies fongiques telle que la tâche helminthosporienne causée par *Bipolaris sorokiniana*. Par ailleurs, Harmas et Terba (1984) ont rapporté que le contenu élevé des polyphénols totaux dans les génotypes résistants de blé contre la rouille, est contrôlé par la présence d'une gamme de gènes Sr (Sr8a, Sr5 et Sr30) (Ahlawat, 2007). Selon Luthra *et al.* (1988), des études ont également montré que les changements qualitatifs et quantitatifs de ces composés se produisent généralement après une infection fongique.

Parmi les polyphénols constitutionnels des parois cellulaires figure la lignine. Il a été constaté que dans les variétés de blé hautement résistantes, une augmentation dans les activités de la voie des phénylpropanoïdes générale et de la voie spécifique de biosynthèse de la lignine (Moerschbacher, 1989). La teneur en lignine des végétaux est reconnue depuis longtemps comme un facteur important dans la réponse à la résistance contre les agents pathogènes. La lignine est extrêmement résistante à la dégradation microbienne et constitue ainsi l'une des barrières les plus efficaces contre l'invasion pathogène. En plus du rôle de la lignine comme un facteur de résistance préformé, le processus de lignification a été proposé comme un mécanisme de résistance active des plantes contre les champignons (Moerschbacher *et al.*, 1990).

Selon Kusumoto *et al.* (2007), un autre composé phénolique, l'acide salicylique, semble constituer un moyen de défense chimique de nombreuses espèces végétales contre la résistance aux maladies fongiques. Une étude antérieure portant sur l'effet de différents acides phénoliques sur la croissance de *F. graminearum* avait montré que les dérivés de l'acide cinnamique avaient une action inhibitrice de la croissance mycélienne plus importante que celle des dérivés de l'acide benzoïque (Favre, 2004). Guiraud *et al.* (1995) ont étudié un autre composé phénolique, l'acide férulique. Ils ont attribué sa toxicité envers la croissance de divers champignons à ses propriétés lipophiles. Selon Tomás-Barberán *et al.* (1990), la propriété lipophile et/ou la présence au moins d'un groupe hydroxyle sont considérés comme un

dispositif structural essentiel pour une bonne activité antifongique. La propriété lipophile permet aux phénols actifs de pénétrer à travers les membranes biologiques tandis que les groupes d'hydroxyle peuvent agir par l'inhibition de la phosphorylation oxydative.

Pour l'analyse mycologique, 159 souches de moisissures ont été isolées des échantillons. Il est à constater que malgré l'apparence saine des grains, le taux de leur contamination s'est révélé très élevé, ce qui signifie la présence d'une contamination profonde. Sur le plan inter-variétal, la variété MBB semble être la plus contaminée, et la variété VITRON est la plus résistante.

Sur l'ensemble des variétés, sept principaux genres ont été identifiés dont le classement par ordre de prévalence est : *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Fusarium* et *Bipolaris*, et en dernière position le genre *Penicillium*. En se référant à la bibliographie, ces genres contaminent les grains de blé au sein de l'épi dès la récolte jusqu'au stockage, ils sont les mêmes que ceux signalés par la F.A.O (1984) et Tahani *et al.* (2008). Le genre *Alternaria* est le plus prévalent dans toutes les variétés. Il est reconnu que ce genre constitue une flore hygrophile qui a besoin d'une humidité relative très élevée pour se développer. Comme le taux d'humidité n'est pas élevé dans les grains, la dominance de ce genre peut être probablement due à une contamination possible avant la récolte. Les genres *Alternaria* et *Fusarium* sont considérés comme des moisissures de champ (Cahagnier *et al.* 1997; Breton, 1990).

A l'issue des résultats obtenus, les genres *Aspergillus* et *Penicillium* semblent être moins dominants avec des pourcentages faibles, ils sont considérés comme des moisissures de stockage (Cahagnier, 1996 et Feillet, 2000). Malgré que ces deux derniers genres tolèrent des humidités beaucoup plus faibles, lorsqu'ils existent seront à l'origine de la plupart des accidents de conservation pour les produits considérés (Tahani *et al.*, 2008; Cahagnier *et al.*, 1997). Les genres : *Aureobasidium*, *Rhizopus* et *Bipolaris* sont considérés comme des flores intermédiaires qui peuvent contaminer les grains de blé (Godon et Loisel, 1997).

Les résultats de l'activité antifongique des extraits polyphénoliques, *in vitro*, ont montré une inhibition efficace de la croissance mycélienne mais de façon différente. Les extraits polyphénoliques n'ont pas le même pourcentage d'inhibition pour la même concentration vis-à-vis des souches testées. Beaucoup de travaux notamment ceux de Raj *et al.* (2001), Cushnie et Lamb (2005) et Lattanzio *et al.* (2006) ont montré un effet antifongique des composés phénoliques. Chez les plantes infectées, le dépôt de composés phénoliques est une partie du

renforcement de la paroi cellulaire qui limite l'invasion pathogène. L'accumulation de substances phénoliques solubles, liées à la paroi cellulaire des tissus végétaux en réponse à une attaque par les pathogènes fongiques, a été également suggérée comme une stratégie de défense (Bhuiyan *et al.*, 2009).

D'une manière générale, nous avons constaté que pour la même concentration (40 mg.ml^{-1}), les pourcentages d'inhibition sont plus élevés avec les extraits polyphénoliques provenant des échantillons sains que pour ceux des échantillons altérés vis à vis de la même souche. Ce qui veut dire que sur le plan quantitatif, la teneur en polyphénols totaux des échantillons sains est supérieure à celle des échantillons altérés. Sur le plan qualitatif, il est probable que la nature des extraits polyphénoliques des échantillons sains soit différente de celle des extraits polyphénoliques des échantillons altérés, mais nous ne pouvons confirmer cette différence qu'après avoir identifier les composés polyphénoliques extraits des échantillons sains et altérés. Les travaux de Friend (1985) ont confirmé des changements qualitatifs et quantitatifs dans le contenu phénolique après une infection des tissus végétaux par des organismes pathogènes. En effet, la résistance aux maladies fongiques est liée dans certains cas à la synthèse de composés phénoliques spécifiques en réponse à l'infection, dont l'un de ces composés peut avoir un effet inhibiteur plus élevé sur certaines souches de moisissures que sur d'autres. Dans d'autres cas, la résistance aux maladies fongiques semble être associée à l'effet cumulatif de l'ensemble de plusieurs composés phénoliques (Mccallum et Walker, 1990).

De même, les valeurs des CI50 diffèrent d'une manière générale selon la souche testée et l'infestation ou non des échantillons à partir desquels ils sont extraits. Selon la littérature, ces différences sont d'ordres quantitatif et/ ou qualitatif.

D'une manière générale, le test de corrélation a montré une corrélation hautement et négativement significative ($r = - 0,818$) entre la teneur en polyphénols totaux et le pourcentage de contamination. Nous pouvons avancer comme hypothèse soit lorsque le pourcentage de contamination est élevé, il entraîne une réduction de la teneur en polyphénols du grain, soit c'est l'inverse lorsque la teneur en polyphénols du grain est faible, elle n'empêche pas le développement des moisissures et les barrières de défense sont pratiquement faibles. En se référant à la bibliographie, c'est probablement la deuxième hypothèse qu'est valable, donc avec une teneur en polyphénols importante, le grain de blé devient plus résistant à l'attaque fongique. Dans une autre étude, en s'intéressant à l'un des

composés phénoliques : l'acide salicylique, Malamy et Klessig (1992) ont signalé une corrélation entre les taux de ce composé et la résistance à l'infection par *populea Dothiciza* et *Fusarium oxysporum*.

Une autre corrélation hautement et positivement significative ($r = 0,779$) entre la teneur en polyphénols totaux et le taux d'extrait polyphénolique sec a été enregistrée, ce qui signifie que plus la quantité d'extrait sec récupéré est importante, plus la teneur en polyphénols est élevée. Parmi les corrélations moyennement significatives, une corrélation positive ($r = 0.543$) a été observée entre le taux d'humidité et le pourcentage de contamination. L'augmentation de la teneur en eau des grains de blé, au cours de la conservation, provoque des altérations pendant le stockage des grains. En effet, l'altération des grains se traduit rapidement par une perte du pouvoir germinatif chez les semences, une prolifération des moisissures dont certaines génèrent des substances toxiques et une intensification de la respiration dont les deux principales conséquences sont une perte de matière sèche et une augmentation de température (Feillet, 2000).

Conclusion
et
Perspectives

Cette étude a été conduite dans le but d'évaluer la teneur en polyphénols totaux des grains entiers de blé dur, de chercher les principaux genres de moisissures contaminant ces grains en tenant compte de l'effet intra-variétal (échantillons sains et altérés de la même variété) et l'effet inter-variétal (échantillons appartenant à différentes variétés) et de tester *in vitro* l'effet antifongique des polyphénols totaux sur des souches des moisissures isolées.

Concernant l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux, sur le plan intra-variétal, les principaux résultats obtenus indiquent que les échantillons sains présentent une teneur plus élevée en polyphénols totaux par rapport aux échantillons altérés. D'une manière générale, il y a une différence significative pour la teneur en polyphénols totaux entre les variétés analysés de blé d'une part et entre les échantillons sains et altérés d'autre part. Les variétés étudiées sont classées selon l'ordre suivant : SIMETO >VITRON> MBB > CIRTA.

Au terme de l'analyse mycologique, nous avons pu isoler et purifier, à partir des échantillons (sains et altérés) des variétés analysées de blé dur, cent cinquante neuf souches de moisissures, regroupées en sept genres (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aureobasidium* et *Bipolaris*). Le pourcentage de contamination est plus élevé chez les échantillons altérés que chez les échantillons sains.

Quant à l'évaluation de l'activité antifongique des extraits polyphénoliques, il semble qu'ils n'ont pas le même pouvoir antifongique, la concentration et la nature de l'extrait polyphénolique appliqué semble aussi avoir un effet significatif vis-à-vis des souches des moisissures testées.

Une forte corrélation, significativement négative, entre la teneur en polyphénols totaux et le pourcentage de contamination a été révélée, il semble que la teneur élevée en polyphénols totaux dans les grains de blé réduit l'infestation fongique.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie afin de quantifier et de caractériser la nature des composés polyphénoliques existant dans les différentes couches histologiques du grain de blé, d'évaluer le pouvoir antifongique de chaque composé phénolique et de voir la possibilité d'amélioration génétique pour la teneur en ces composés polyphénoliques afin d'améliorer la résistance à l'infestation fongique.

*Références
bibliographiques*

1. **Akin Danny E., 1995.** Microspectrophotometric Characterization of Aroma et Cohituents in Cell Walls of Hard and Soft Wheats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 68, pp 207-214.
2. **Antoine C., Peyron S., Lullien-Pellerin V., Abecassis J. and Rouau X., 2004.** Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers. *Journal of Cereal Science*, vol. 39, pp 387-393.
3. **Atanasova A., Atanasova M. et Ribarova F., 2009.** Phenols et flavonoides totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*). *Revue de génie industriel*, vol. 4, pp 21-25.
5. **Balasundram N. , Sundram K. and Samman S., 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses Analytical, Nutritional and Clinical Methods. *Food Chemistry*, vol. 99, pp 191–203.
6. **Bariana H. S. et McIntosh R. A., 1993.** Cytogenetic studies in wheat. XV: Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. *Genome*, vol. 36, pp 476-482.
7. **Barron C., Surget A. and Rouau X., 2007.** Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science*, vol. 45, pp 88-96.
8. **Bartali E.H., 1995.** Système post récolte des céréales au Maroc. *Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture*, FAO, 32 p.
9. **Bartali E.H., Afie S. et Persoons E., 1989.** Stockage des céréales dans des entrepôts souterrains. Céréales en régions chaudes. *AUPELF-UREF, Edition John Libbey Eurotext*, Paris, pp 27-38.
10. **Bartali H. et Debbarh A., 1991.** “Évaluation et amélioration de la technique traditionnelle du stockage souterrain des céréales au Maroc”, Hommes, Terre et Eaux, *Revue Marocaine des Sciences et Techniques du Développement Rural*, n°82, pp 3-20.
11. **Baudry C. et Brézellec H., 2006.** Microbiologie, immunologie. 2^{ème} édition, *Porphyre*, pp 30-39.

12. **Benbrook Charles M., 2005.** Elevating Antioxidant Levels in Food through Organic Farming and Food Processing. *An Organic Center State of Science Review*, pp 39-40.
13. **Bennick A., 2002.** Interacxion of Plant Polyphenols with Salivary Proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, vol. 13, pp 184-196.
14. **Beta T., Nam S., Dexter Jim E. and Harry D., 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, vol. 82, pp 390-393.
15. **Bhalodia Nayan R., Nariya Pankaj B. and Shukla V. J., 2011.** Antibacterial and Antifungal activity from Flower Extracts of Cassia fistula L. : An Ethnomedicinal Plant. *International Journal of PharmTech Research*, vol. 3, pp 160-168.
16. **Bhuiyan Nazmul H. , Selvaraj Gopalan , Wei Yangdou and KingJohn, 2009.** Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, pp 509-521.
17. **Bidlack J., Malone M. and Benson R., 1992.** Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science archives*, vol. 72, pp 51-56.
18. **Bourgeois C.N., Mescmle J.F. et Zucca J., 1996.** microbiologie alimentaire. tome 1 « aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». *Edition Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, pp 393 – 414.
19. **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2^{ème} édition, *Masson*, Paris, 512 p.
20. **Bouchet Philippe, 2005.** Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée. 2^{ème} édition, *Elsevier Masson*, Paris, pp 178-179.
21. **Boudreau A. et Ménard G., 1992.** Le blé: éléments fondamentaux et transformation. *Edition Presses Université Laval*, Paris, pp 25 - 62.

22. **Boutigny A.L., Atanasova-Pénichon V., Benet M., Barreau C. and Richard-Forget F., 2010.** Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *EurJournal of Plant Pathology*, vol. 127, pp 275–286.
23. **Bradbury D., Macmasters M. M. and Cull I. M., 1956.** Structure of the mature wheat kernel. II. Microscopic structure of pericarp, seed coat, and other coverings of the endosperm and germ of hard red winter wheat. *Cereal Chemistry*, vol. 33, pp 342-360.
24. **Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007.** Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. *Edition Educagri*, pp 99-108.
25. **Bunzel M., Ralph J., Lu F., Hatfield Ronald D. and Steinhart H., 2004.** Lignins and Ferulate-Coniferyl Alcohol Cross-Coupling Products in Cereal Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp 6496–6502.
26. **Butt M. S., Nasir M., Akhtar S. and Sharif K., 2004.** Effect of moisture and packaging on the Shelf life of wheat flour. *Internet Journal of Food Safety*, vol. 4, pp 1-6.
27. **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, pp 392 – 414.
28. **Calvel R., 1984.** La boulangerie moderne. *Edition EYROLLES*, Paris, pp 19-20.
29. **Champion R. 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. *Edition Quae. INRA*, pp 43-56.
30. **Chen F., He Z. H., Chen D. S., Zhang C. L., Zhang Y. and Xia X. C. 2007.** Influence of puroindoline alleles on milling performance and qualities of Chinese noodles, steamed bread and pan bread in spring wheats. *Journal of Cereal Science*, vol. 45, pp 59–66.
31. **Chene C., 2006.** La maîtrise du risque moisissures : application aux aliments à humidité intermédiaire, Rôle Technologique. *Agro-alimentaire- Newsletter n°9*, pp 1-5.
32. **Cheyrier V., 2005.** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, pp 223–229.

33. Cruz J.F., Dimanche P., Ducamp-Collin M.N., Fliedel G., Joas J., Marchand J.L., Mestres C. et Troude F., 2002. La récolte, le stockage et la première transformation In « Mémento de l'agronome ». CIRAD-GRET. Editions Quae, Paris, pp 717-746.
34. Čukelj N., Novotni D. and Ćurić D., 2010. Antioxidant Properties of Whole Grain Cereals. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, vol. 5, pp 18-23.
35. Cushnie T.P. and Lamb Andrew J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 26, pp 343–356.
36. Daniel O., Meier M. S., Schlatter J. and Frischknecht P., 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants : ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.* 107, Suppl. 01, pp 109-114.
37. D'Archivio M., Filesi C. and Di Benedetto R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, vol 43, pp 348–61.
38. Dicko Mamoudou H., Gruppen H., Traoré Alfred S., Voragen Alphons G. J. and Van Berkel Willem J. H., 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* vol. 1, pp 21-38.
39. Derache R ., 1986. technologie et sécurité des aliments. *Edition Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, pp 199 – 228.
40. Djermoun A., 2009. La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie*, n° 01, pp 45-53.
41. Dykes L. and Rooney L. W., 2007. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal foods world*, pp 105-111.
42. Dubin, H. J. and Bimb, H. P., 1991, Effects of soil and foliar treatment on yields and disease of wheat in lowland Nepal. *Wheat for the Non-Traditional, Warm Areas. Edition Saunders, D. A., Cimmyt, Mexico DF*, pp. 484-485.

43. **Farrant Jill M., Lehner A., Cooper K. and Wiswedel S., 2009.** Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. *The Plant Journal*, vol. 57, pp 65–79.
44. **Feillet.P., 2000.** Le grain de blé, composition et utilisation. *Edition INRA, Paris*, 308 p.
45. **F.A.O., 1984.** Parte de la qualité des grains alimentaire récolte. *Etude FAO Alimentation et Nutrition*, 165 p.
46. **FAO. 1994.** Synthèse de l'expérience africaine en amélioration des techniques après-récoltes. *Basée sur les journées techniques accra, Ghana, 4-8 juillet* 41p.
47. **Friend J., 1985.** Phenolic substances and plant disease. In « The Biochemistry of Plant Phenolics » par **Van Sumere C.F. et Lea P.J.** *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, vol. 25, pp 367-392.
48. **Godon B., Willm C., 1991.** Les industries de première transformation des céréales. *Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris*, 679 p.
49. **Godon B. et Loisel W.** Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. *Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris*. 819 p.
50. **Greffeuille V., Mabile F., Rousset M., Oury F.-X., Abecassis J. and Lullien-Pellerin V., 2007.** Mechanical properties of outer layers from near-isogenic lines of common wheat differing in hardness. *Journal of Cereal Science*, vol. 45, pp 227-235.
51. **Guleria S. and Kumar A., 2006.** Qualitative profiling of phenols and extracellular proteins induced in mustard (*Brassica juncea*) in response to benzothiadiazole treatment. *Journal of Cell and Molecular Biology*, vol. 5, pp 51-56.
52. **Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie alimentaire. *Edition Duond, Paris*, pp 8-101.
53. **Guiraud P., Steiman R., Seigle-Murandi F. & Benoit-Guyod J.L., 1995.** Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 32, pp 29-33.
54. **Han X., Shen T. and Lou H., 2007.** Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 8, pp 950-988.

55. **Harmas, H. and Terba, M., 1984**, Metabolism of phenolic compounds in healthy and brown rust infected barley and wheat varieties. *Phytopathol. Zeitschrift*, vol. 111, pp 283-296.
56. **Hättenschwiler S. and Vitousek Peter M., 2000**. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Elsevier Science*, vol. 15, pp 238-244.
57. **Hemery Youna, Rouau Xavier, Lullien-Pellerin Valérie, Barron Cécile and Abecassis Joël, 2007**. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, vol. 46, pp 327–347.
58. **Himi E., Nisar A. and Noda K., 2005**. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. *Genome*, vol. 48, pp 747–754.
59. **Hoseney, R. C. 1994**. Principles of cereal science and technology. 2nd Edition, *American Association of Cereal Chemists*, 378 p.
60. **Jones C. M., Mes P. and Myers R. 2003**. Characterization and Inheritance of the Anthocyanin fruit (AFT) Tomato. *Journal of Heredity*, vol. 94, pp 449-456.
61. **Jouan J.P., 2007**. Vaches laitières et mycotoxines, l'étau se resserre. En attendant les outils de diagnostic. *P.L.M. Production laitière moderne*, n° 383, pp 46-48.
62. **Kahkonen Marja P., Hopia Anu I., Vuorela Heikki J., Rauha Jussi-P., Pihlaja K., Kujala T.S. and Heinonen M., 1999**. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, pp 3954-3962.
63. **Kalt W., 2005**. Effects of Production and Processing Factors on Major Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of food science*, vol. 70, pp12-19.
64. **Kanafani-Zahar A., 1994**. Mūne: la conservation alimentaire traditionnelle au Liban. *Editions MSH*, vol., pp 171-173.
65. **Karamać M., Sendrejová E., Kosińska A. and Urminská D., 2007**. Presence of Ferulic Acid in Wheat Glutenin Fraction and its Enzymatic Hydrolysates – a Short Report Czech. *Journal of Food Science*, vol. 25, pp 359–364.

66. **Karou D., Dicko M. H., Simpore J. and Traore A. S., 2005.** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, pp 823-828.
67. **Kim Kyung-H., Tsao R., Yang R. and Cui Steve W., 2006.** Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, vol. 95, pp 466-473.
68. **Kodio O., 1989.** Structures paysannes de stockage. Céréales en régions chaudes. *AUPELF-UREF, Edition John Libbey Eurotext, Paris*, pp 19-25.
69. **Kondakova V., Tsvetkov I., Batchvarova R., Badjakov I., Dzhambazova T. and Slavov S., 2009.** Phenol compounds - qualitative index in small fruits. *Biotechnol. & Biotechnol.*, pp 1444-1448.
70. **Kusińska E., 2001.** Effet de la teneur en humidité des grains de triticales sur l'échauffement spontané des grains et sur la pression contre la paroi du silo. *Int. Agrophysic*, vol. 15, pp 247-254.
71. **Kusumoto D. , Goldwasser Y. , Xie X., Yoneyama K. , Takeuchi Y. and Yoneyama K., 2007.** Resistance of Red Clover (*Trifolium pratense*) to the Root Parasitic Plant *Orobancha minor* is Activated by Salicylate but not by Jasmonate. *Annals of Botany*, vol. 100, pp 537-544.
72. **Lattanzio V., Lattanzio Veronica M. T. and Cardinalli A., 2006.** Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Editor: Filippo Imperato. Phytochemistry: Advances in Research*, pp 23-67.
73. **Le Gall G., DuPont M. S., Mellon F. A., Davis A. L., Collins G. J., Verhoeyen M. E. and Colquhoun I. J. 2003.** Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, pp 2438-2446.
74. **Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. *Edition De Boeck Supérieur*, pp 111-122.

75. **Lewitt J., 1980.** Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol. 1, *Academic Press, New York*, pp 87–90.
76. **Leyral G. et Vierling É., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4^{ème} édition, *Doin*, pp 20-36.
77. **Lloyd BJ, Siebenmorgen T.J. and Beers K. W., 2000.** Effect of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry*, vol. 77, pp 551– 555.
78. **Luthar 1992.** Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum Moench*). *Fagopyrum*, vol. 12, pp 36 – 42.
79. **Luthra Y. D., Joshi U. M., Gandhi S. K. and Arora S. K., 1988.** Biochemical alterations in downy mildew infected lucerne leaves. *Indian Phytopathology*, vol. 41, pp 100.
80. **Macrae W. D. and Towers G. H. N., 1984.** Biological Activities of Lignans. *Phytochemistry* 23, pp 1207-1220.
81. **Malamy J. and Klessig D.F., 1992.** Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal*, vol. 2, pp 643- 654.
82. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol.79, pp727– 47.
83. **Masibo, M. and He, Q., 2009.** *In vitro* antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. Malaysian. *Journal of Microbiology*, vol 5, pp 73- 80.
84. **Mathieu Marie-José et Fonteneau Jean-Marie, 2008.** Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie. *Edition Porph.*, pp 509-516.
85. **Mccallum J. A. and Walker J. R. L., 1990.** Proanthocyanidins in Wheat Bran. *Cereal Chemistry*, vol. 67, pp 282-285.
86. **Meyer A., Deiana J. et Bernard A., 2004.** Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition, *Doin*, pp 115- 172.

87. **Moerschbacher Bruno M., 1989.** Plant Cell Wall Polymers. *ACS Symposium Series*, vol. 399, pp 370–382.
88. **Moerschbacher Bruno M., Noll Ulrike, Gorrichon Liliane and Reisener Hans-Joachim, 1990.** Specific Inhibition of Lignification Breaks Hypersensitive Resistance of Wheat to Stem Rust. *Plant Physiol*, vol. 93, pp 465-470.
89. **Mohammadi V., Bihamta M.R. and Zali A.A., 2007.** Evaluation of Screening Techniques for Heat Tolérance in Wheat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 10, pp 887-892.
90. **Moore John P., Vitré-Gibouin M., Farrant Jill M. and Driouich A., 2008.** Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*, vol. 134, pp 237–245.
91. **Moreau C., 1996.** Les moisissures In “microbiologie industrielle”. *Edition technique et documentation Lavoisier*, Paris, pp 236- 248.
92. **Moura J., Bonine C., Viana J., Dornelas M.C. and Mazzafera P., 2010.** Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 52, p. 360–376.
93. **Mpofu A., Sapirstein Harry D. and Beta T., 2006.** Genotype and Environmental Variation in Phenolic Content, Phenolic Acid Composition, and Antioxidant Activity of Hard Spring Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, pp 1265-1270.
94. **Multon J.L., 1982.** Conservation et stockage des grains et graines et produit dérivé. Volume 01, *Edition Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, 576 p.
95. **Mursu J., 2007.** The Role of Polyphenols in Cardiovascular Diseases. *Kuopio University Publications D. Medical Sciences*, vol. 409, 88 p.
96. **Naczki M. et Shahidi F., 2006.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, pp 1523–1542.

- 97. Nagao S., Takahashi M. and Miyamoto T. 1957.** Genetical studies on rice plant, XXI: Biochemical studies on red rice pigmentation. *Japanese Journal of Genetics*, vol. 32, pp124-128.
- 98. Ndiaye B., 1999.** Manuel de stockage et de conservation des céréales et des oléagineux. *Cellule Centrale d'Appui Technique PADER II. Thiès (Sénégal)*, n°100, 23 p.
- 99. Niggeweg R., Michael A. J. and Martin C. 2004.** Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*, vol. 22, pp 746-754.
- 100. Niquet G., 2006.** Stockage à la ferme des grains issus de l'agriculture biologique. Office national interprofessionnel des céréales. *Institut du végétal ARVALIS*, pp 1- 4.
- 101. Ntsam S., 1989.** Pourquoi stocker ? Céréales en régions chaudes. *AUPELF-UREF, Edition John Libbey Eurotext, Paris*, pp 3-8.
- 102. Parker Mary L., Ng Annie and Waldron Keith W., 2005.** The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 85, pp 2539–2547.
- 103. Patil L. C., Lohithaswa H. C., Nadaf H. L., Kalappanavar I. K. et Megeri S. N., 2011.** Biochemical relationship in resistant and susceptible cultivars of spot blotch infected tetraploid wheat. *Karnataka, Journal of Agricultural Science*, vol. 24, pp 520-522.
- 104. Pietta P.G., 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, vol. 63, pp 1035–1042.
- 105. Pitt John I. and Hocking Ailsa D., 2009.** fungi and food spoilage. *3ème édition, Springer*, pp19-51.
- 106. Pomeranz Y., 1987.** Cereal Crops-General. In: Pomeranz, Y., (Eds) VCH Publishers, Inc, New York. *Modern Cereal Science and Technology*, pp 14-23.
- 107. Pomeranz Y., 1988.** Chemical composition of kernel structures. *Wheat: chemistry and technology*, vol. I, pp 97-158.

- 108.Prescott Lansing M., Harley John P. et Klein Donald A., 2003.** Microbiologie. 2^{ème} édition. De Boeck Supérieur, pp 552-569.
- 109.Raj Narayana K., Reddy Sripal M., Chaluvadi M. R. and Krishna D.R., 2001.** bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 33, pp 2-16.
- 110.Ralph John and Helm Richard F., 1993.** Lignin/Hydroxycinnamic Acid/Polysaccharide Complexes: Synthetic Models for Regiochemical Characterization In "Forage Cell Wall Structure and Digestibility" par **H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (1993).** Edition ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp 201-246.
- 111.Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H. and Wout B., 2004.** Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews*, vol. 3, pp 29 – 60.
- 112.Rice-Evans C.A., Miller N. and Paganga G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, pp 933-956.
- 113.Richrad-Molard M., 1997.** Microbiologique des céréales et des farine In « guide pratique d'analyse dans l'industrie des céréales » par **Godon B. et Loisel W. (1997).** Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp 177-190.
- 114.Richrad-Molard M., 1998.** Microbiologique des céréales et des farines In « Les industries de première transformation des céréales. Edition Techniques et Documentation Lavoisier. Paris, pp 159 – 173.
- 115. Robbins Rebecca J., 2003.** Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center*, pp 1-22.
- 116. Rodionova N.A., Kaprel'-yants L.V., Serednitskii P.V. and Kilimnik A.Y., 1992.** Hemicelluloses of cereal grains and their enzyme catalysts. *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 28, pp 485-501.

- 117. Roquebert M. F., 1998.** Introduction à la biologie des moisissures. In « Biodétérioration des matériaux » par Lemaître Christian, Pébère Nadine et Festy Dominique . *Edition EDP Sciences*, pp 59-67.
- 118. Roquebert M. F., 2002.** Les contaminants biologiques des biens culturels. *Edition Elsevier Masson*, pp71-88.
- 119. Ross Alastair B., Shepherd Martin J., Schüpphaus M., Sinclair V., Alfaro B., Kamal-Eldin A. and Åman P., 2003.** Alkylresorcinols in Cereals and Cereal Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, pp 4111–4118.
- 120. Roupe Kathryn A., Remsberg Connie M., Yáñez Jaime A. and Davies Neal M., 2006.** Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. *Current Clinical Pharmacology*, vol. 1, pp 81-101.
- 121. Satish S., Raghavendra M.P., Mohana D.C. and Raveesha K.A., 2010.** *In vitro* evaluation of the antifungal potentiality of Polyalthia longifolia against some sorghum grain moulds. *Journal of Agricultural Technology*, vol. 6, pp 135-150.
- 122. Scalbert Augustin and Williamson Gary, 2000.** Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, vol. 130, pp 2073-2085.
- 123. Scervino Jose M., Ponce Maria A., Erra-bassells R., Vierheilig H., Ocampo Juan A. and Godeas A., 2005.** Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of Gigaspora and Glomus. *Mycological Research*, vol. 109, pp 1-6.
- 124. Schwarz P. B., Kunerth W. H. and Youngs V. L., 1988.** The Distribution of Lignin and Other Fiber Components Within Hard Red Spring Wheat Bran. *Cereal Chemistry*, vol. 65, pp 59-64.
- 125. Selselet-Attou G., 1991.** Technologie des céréales et produits dérivés. Institut de Technologie Agricole-Mostaganem. *Document à l'usage des étudiants, option : Technologie Agro-Alimentaire*. 147 p.
- 126. Shahidi, F. and Wanasundara P. K., 1992.** Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 32, pp 67-103.

127. **Shewry P.R. and Tatham AS, Halford N.G., 1999.** The prolamins of the Triticeae. In « Seed proteins » par **Shewry P. R. and Casey R. (1999)**. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*, pp 35–78.
128. **Slavin Joanne L., Martini Margaret C., Jacobs Jr. David R. and Marquart L., 1999.** Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70, pp 459–463.
129. **Šramková Z., Gregová E. and Šturdíka E., 2009.** Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, vol. 2, pp 115 – 138.
130. **Stern J.L., Hagerman A.E., Steinberg P.D. and Mason P.K., 1996.** Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 22, pp 1877-1899.
131. **Stevanovic T., Diouf Papa N., Garcia P. and Martha E., 2009.** Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. *Current Nutrition & Food Science*, vol. 5, pp 264-295.
132. **Stevenson D.E. and Hurst R.D., 2007.** Polyphenolic phytochemicals –just antioxidants or much more? *Cellular & Molecular Life Sciences*, vol. 64, pp 2900–2916.
133. **Tahani N., Serghini-Caid H., Ouzouline M. et Ahmed E., 2008.** Mycologie du blé tendre : qualité technologique du grain et conséquences sur les produits finis. *Reviews in Biology and Biotechnology*, vol. 7, pp 27-32.
134. **Taşgın E., Atici O. and Nalbantoğlu B., 2003.** Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, vol. 41, pp 231–236.
135. **Tsao R., 2010.** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Guelph Food Research Centre, Agriculture et Agri-Food Canada. *Nutriment*, vol. 2, pp 1231-1246.
136. **Tomás-Barberán F., Iniesta-Sanmartín E., Tomás-Lorente F. and Rumbero A., 1990.** Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry*, vol. 29, pp 1093- 1095.
137. **Vasquez C., Javier A., Casadei de Baptista G. , Gadanha J., Casimiro D. et Pimentel T., Luiz R. , 2008.** Effet du volume de pulvérisation sur l'humidité du maïs entreposé et Grains de blé. *International Journal.*, vol. 51, pp 453-456.

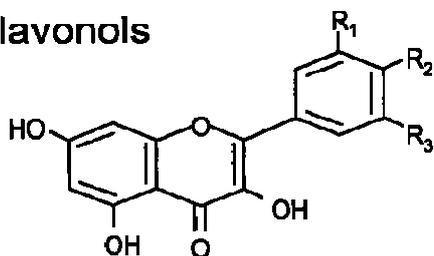
- 138. Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. and Oomah B.D., 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, pp 4113-4117.
- 139. Weichselbaum E. and Buttriss J.L., 2010.** Polyphenols in the diet. British Nutrition Foundation, London, UK. *Nutrition Bulletin*, vol. 35, pp 157–164.
- 140. Zielinski H. and Kozłowska H., 2000.** Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp 2008 - 2016.

Annexes

Annexe I

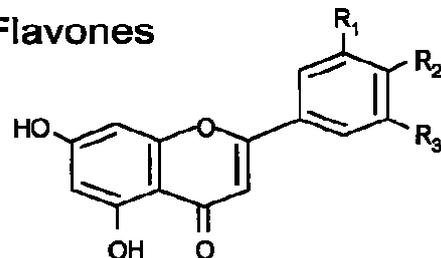
I. 1. Structures chimiques des flavonoïdes (Manach et al., 2004).

Flavonols



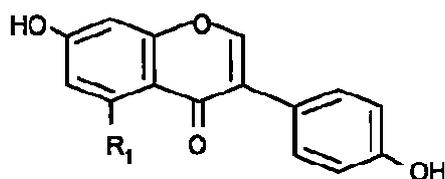
$R_2 = \text{OH}$; $R_1 = R_3 = \text{H}$: Kaempférol
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$: Quercétine
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Myricétine

Flavones



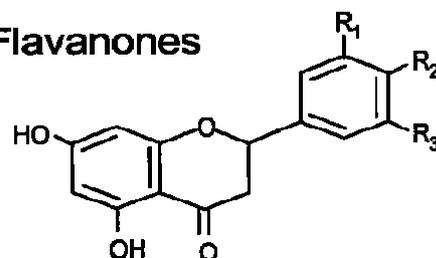
$R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$: Apigénine
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Lutéoline

Isoflavones



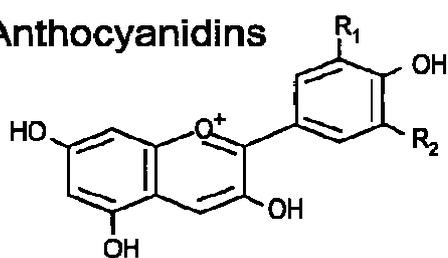
$R_1 = \text{H}$: Daïdezeïn
 $R_1 = \text{OH}$: Genisteïn

Flavanones



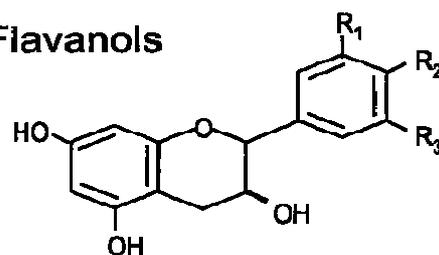
$R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$: Naringénine
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Eriodictyol
 $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OCH}_3$: Hespérétine

Anthocyanidins



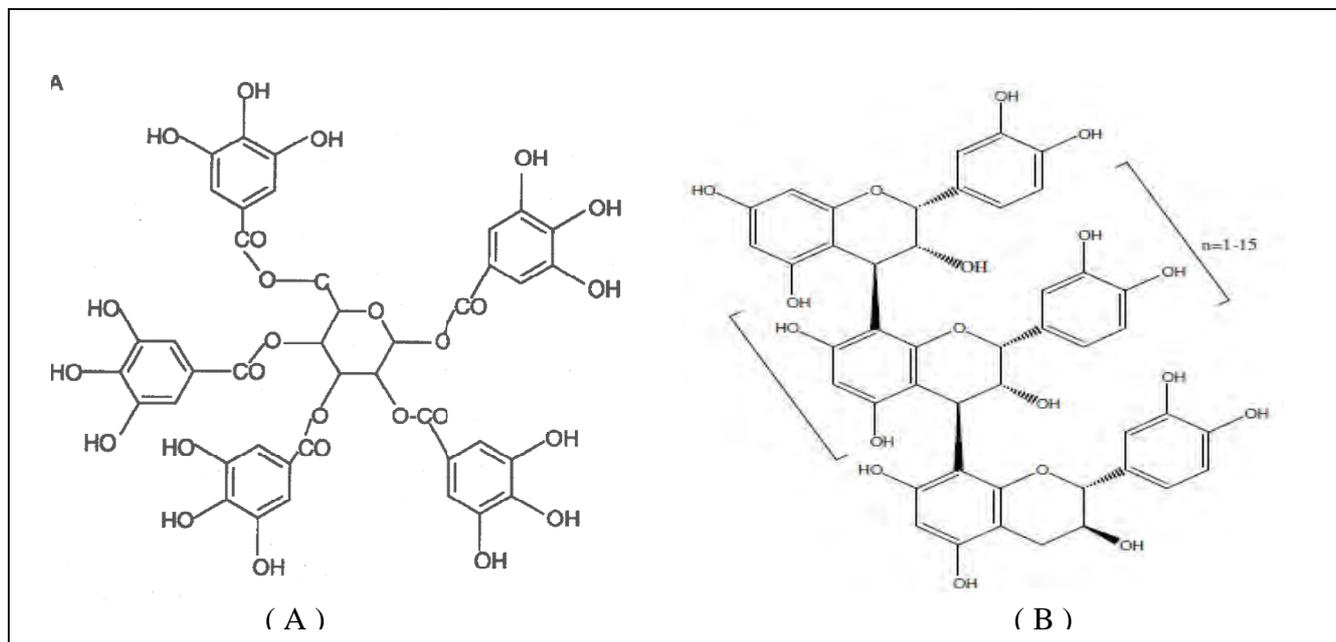
$R_1 = R_3 = \text{H}$: Pélargonidine
 $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$: Cyanidine
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Delphinidine
 $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$: Pétonidine
 $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: Malvidine

Flavanols

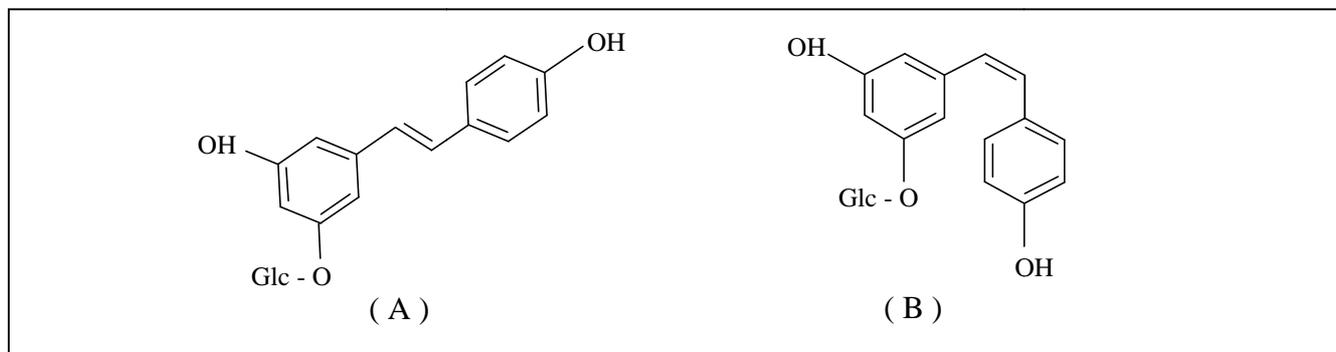


$R_1 = R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$: Catéchines
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallocatéchine

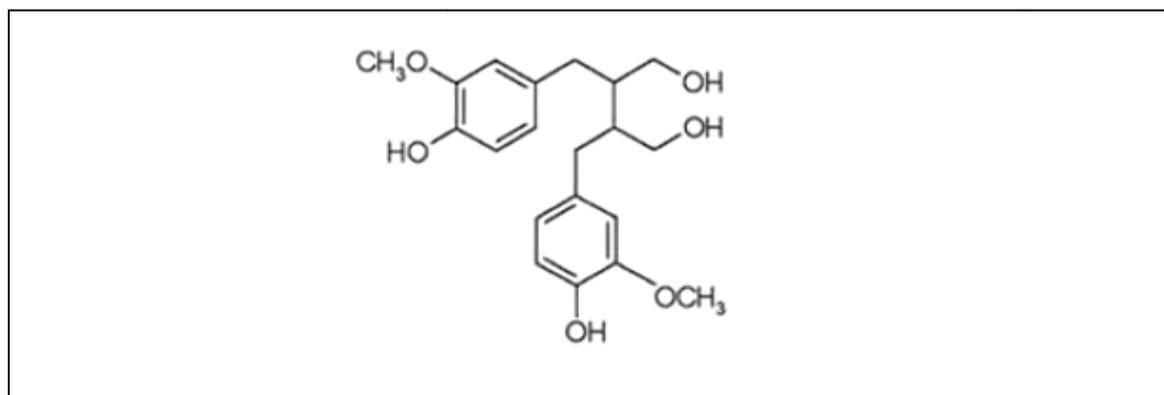
I.2. Structure chimique des tanins : (A) hydrolysables (pentagalloylglucose) (Bennick, 2002) et (B) condensés (proanthocyanidines) (Dicko et al., 2006)



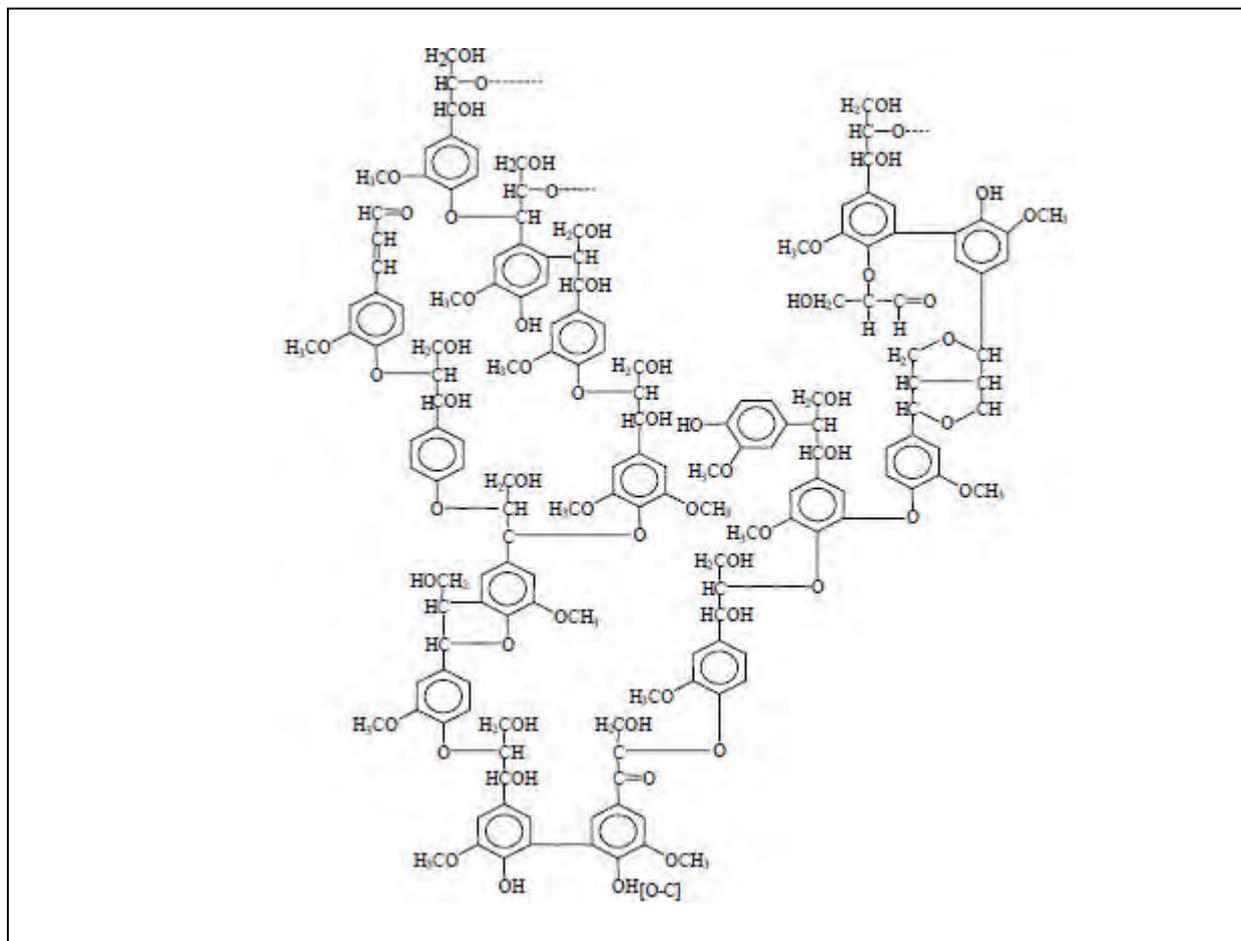
I.3. Structure chimique des stilbènes : (A) *trans*-picéide et (B) *cis*-picéide (KRISA et al., 1997)



I.4. Structure chimique de lignanes du grain de céréales (Dayks et Rooney, 2007)



I.5. Représentation schématique de la lignine de paille de blé (Digabel et Avérous, 2006)



Annexe II

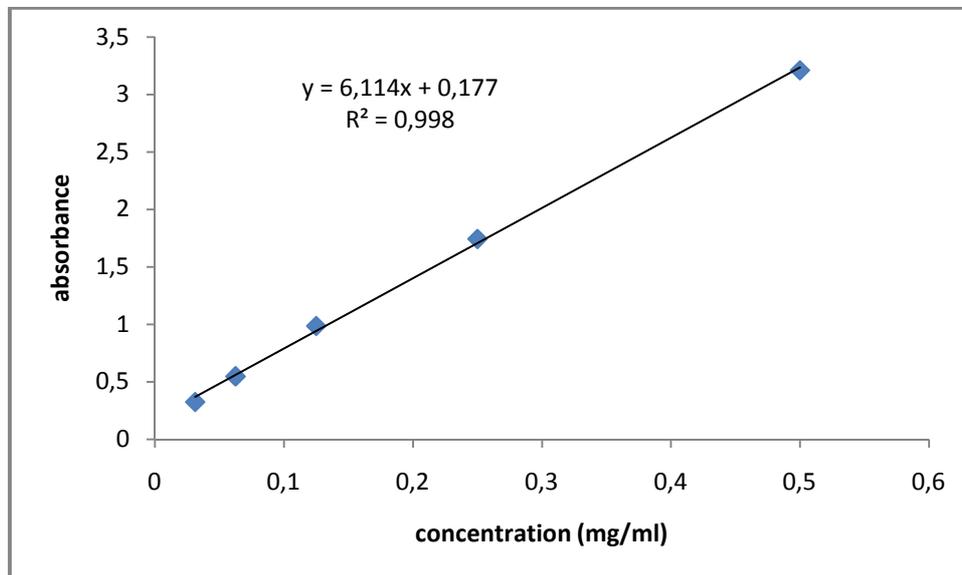
II.1. Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Tableau 01. Valeurs de l'absorbance des différentes concentrations d'acide gallique

| Acide gallique | S | S/2 | S/4 | S/8 | S/16 | S/32 | S/64 |
|------------------------|---|-----|--------|--------|--------|--------|---------|
| Concentration mg/ml | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.0625 | 0.03125 |
| Absorbance | 4 | 4 | 3.2092 | 1.7425 | 0.9854 | 0.5470 | 0.3245 |

- S : Solution ; les dilutions : S/2, S/4, S/8, S/16, S/32 et S/64.

➤ Courbe d'étalonnage d'acide gallique



II.2. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux exprimé en mg EAG /g d'extrait sec

Selon Adesegun et *al.* (2007), le contenu en polyphénols totaux, exprimé en équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec, a été calculé par la formule suivante :

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

T : représente les polyphénols totaux (mg EAG / g d'extrait sec de la plante) ;

C : concentration d'extrait éthanolique équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

V : volume d'extrait éthanolique (ml) ;

M : poids sec d'extrait éthanolique de la plante (g).

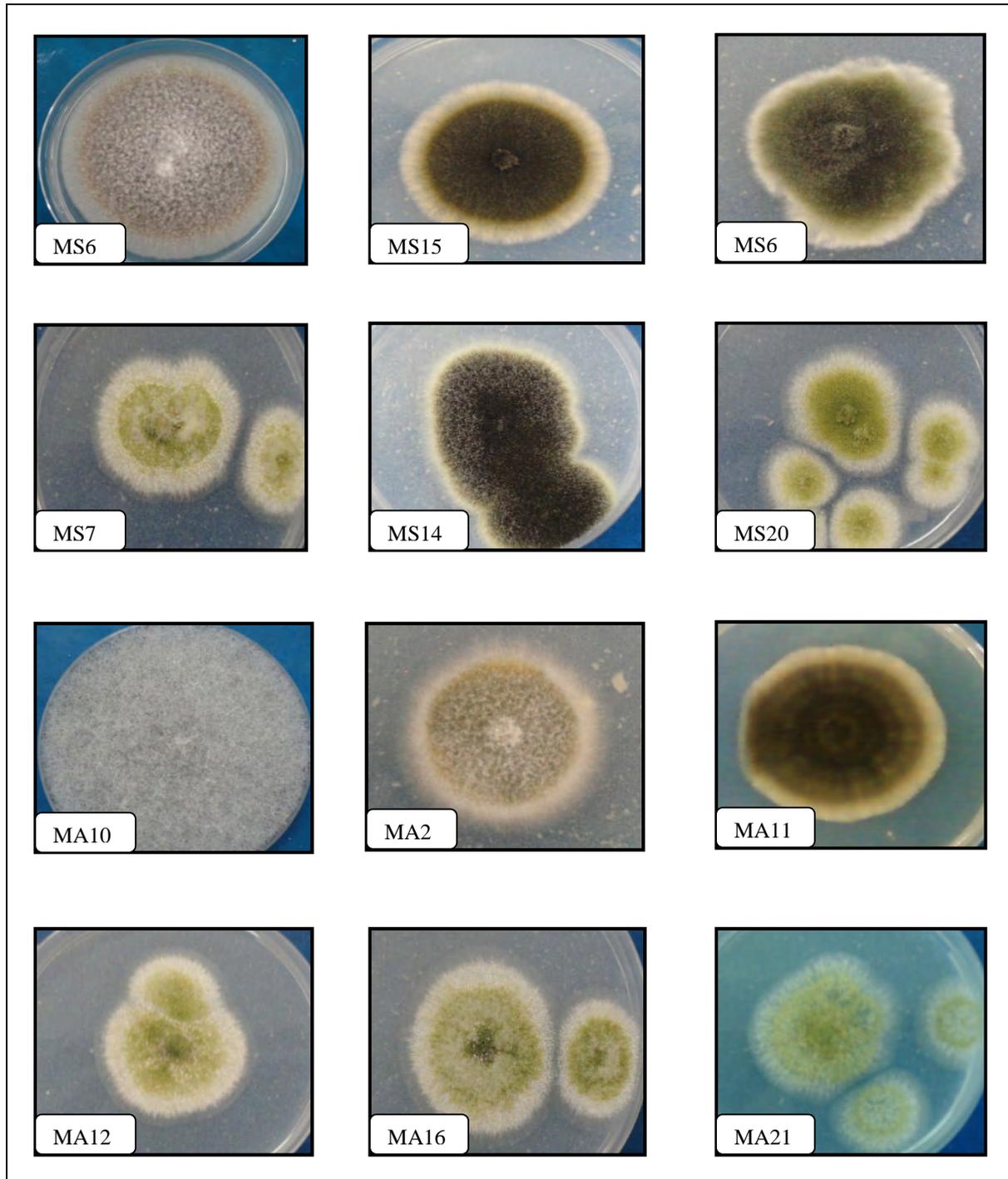
Le Tableau 02 représente les concentrations des polyphénols totaux exprimées en $\mu\text{g EAG} \cdot \text{ml}^{-1}$ récupérées dans $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'extrait sec.

Tableau 02. Teneur des polyphénols totaux en $\mu\text{g EAG} / 40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'extrait sec

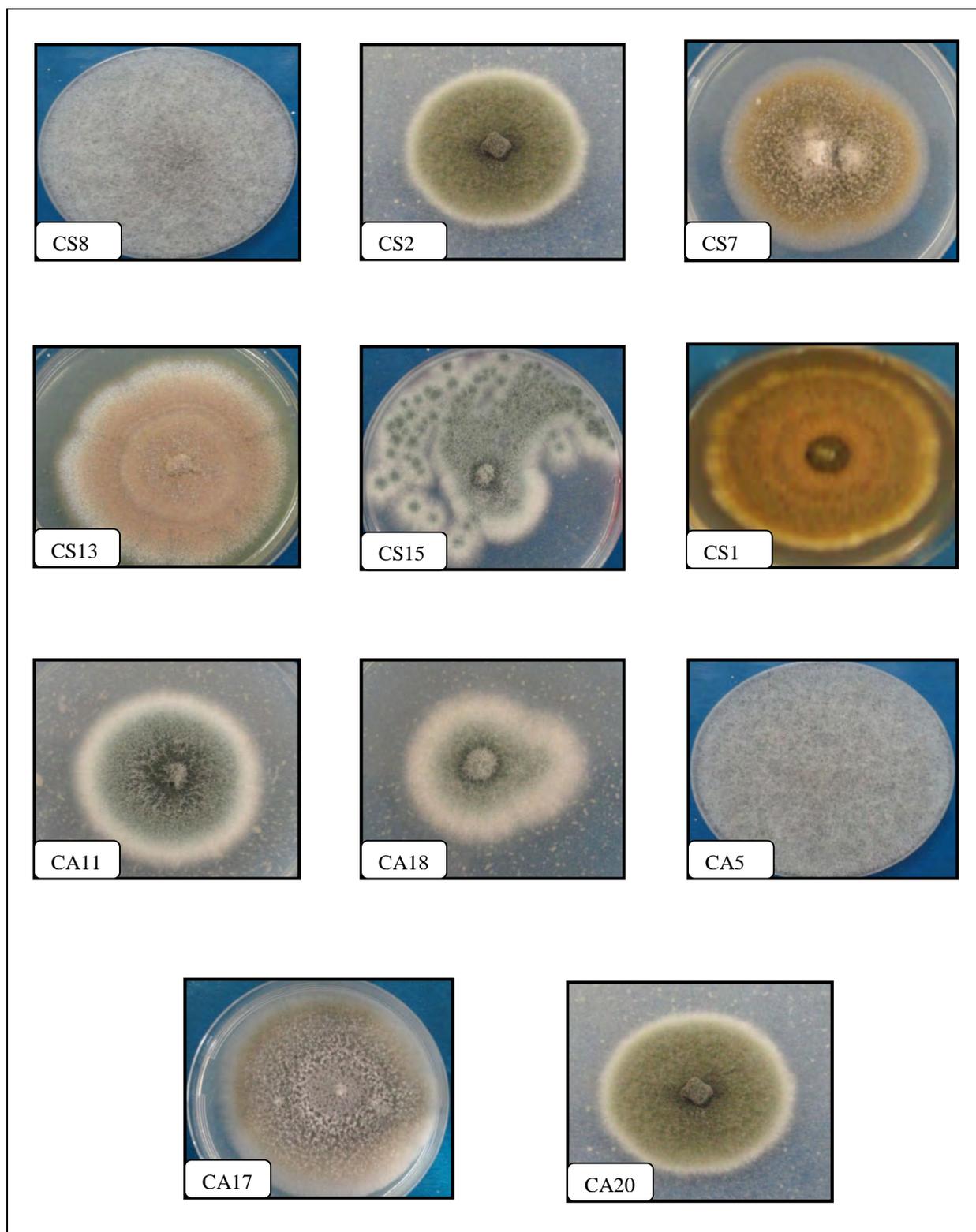
| Variétés | MBB | VITRON | CIRTA | SIMETO |
|---------------------------|------------|---------------|--------------|---------------|
| Echantillon sain | 76.00 | 73.96 | 68.52 | 75.20 |
| Echantillon altéré | 62.72 | 67.92 | 60.00 | 67.32 |

Annexe II

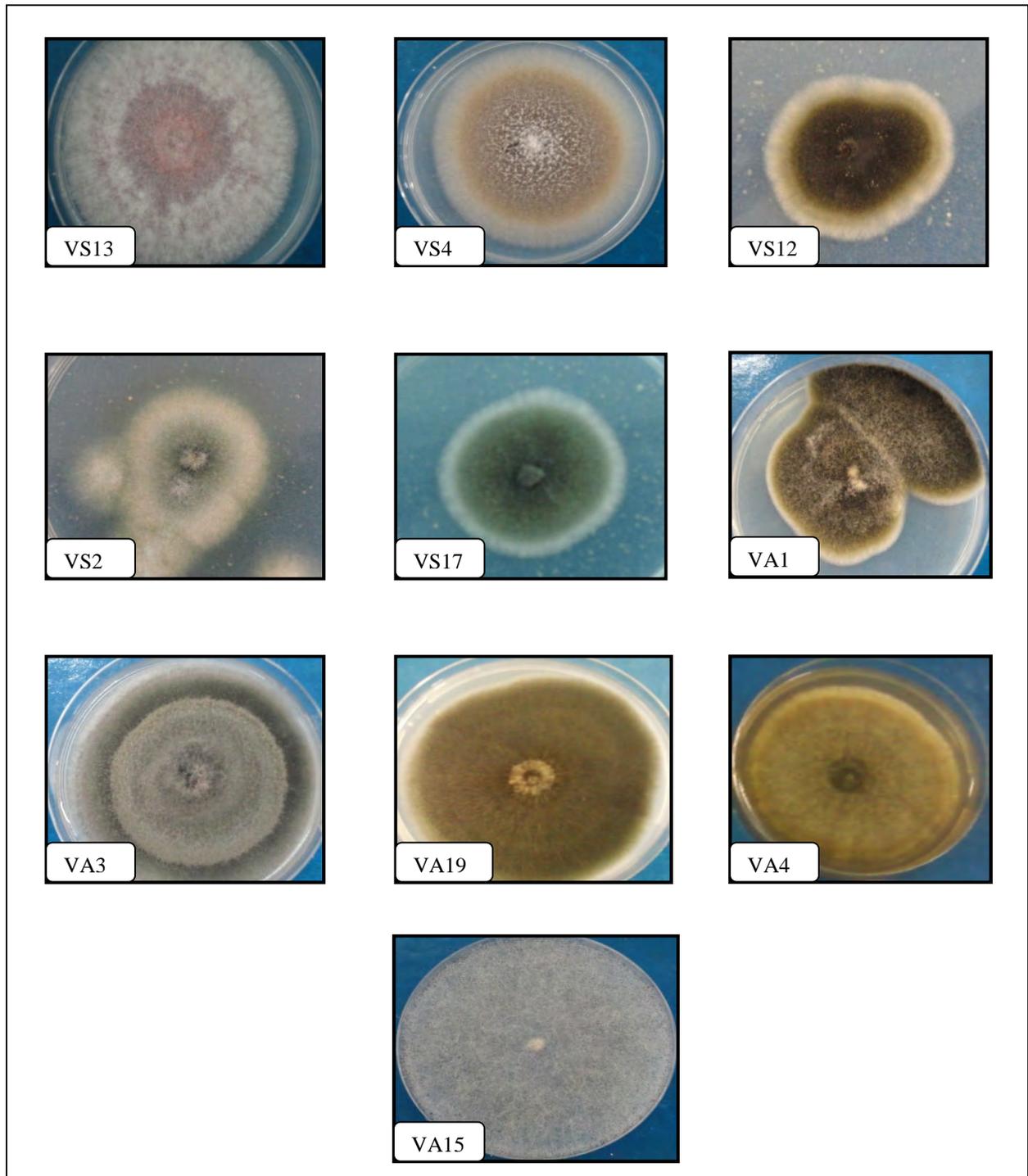
II.1. Mycélium aérien de quelques souches isolées de la variété MBB



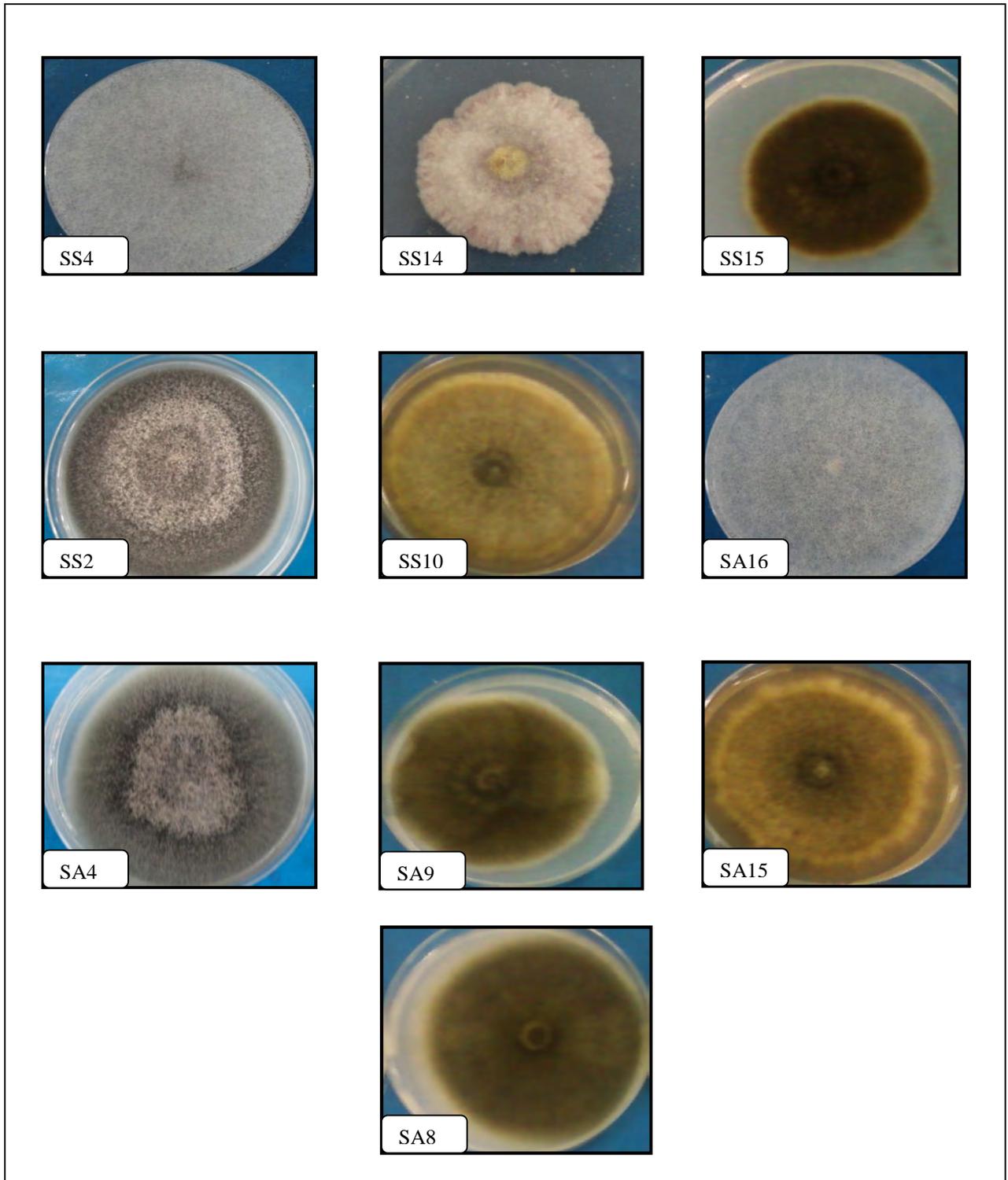
II.2. Mycélium aérien de quelques souches isolées de la variété CIRTA



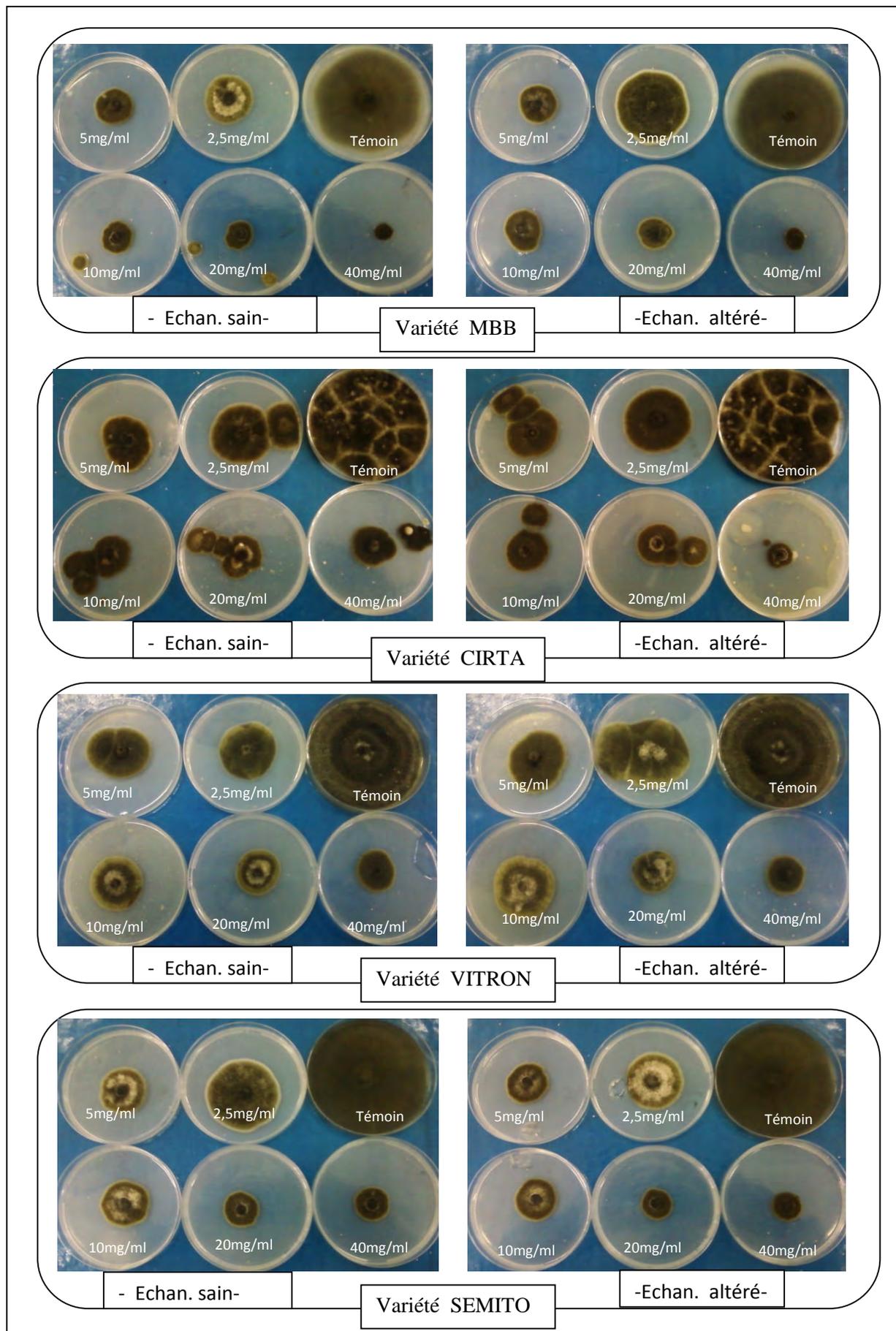
II.3. Mycélium aérien de quelques souches isolées de la variété VITRON



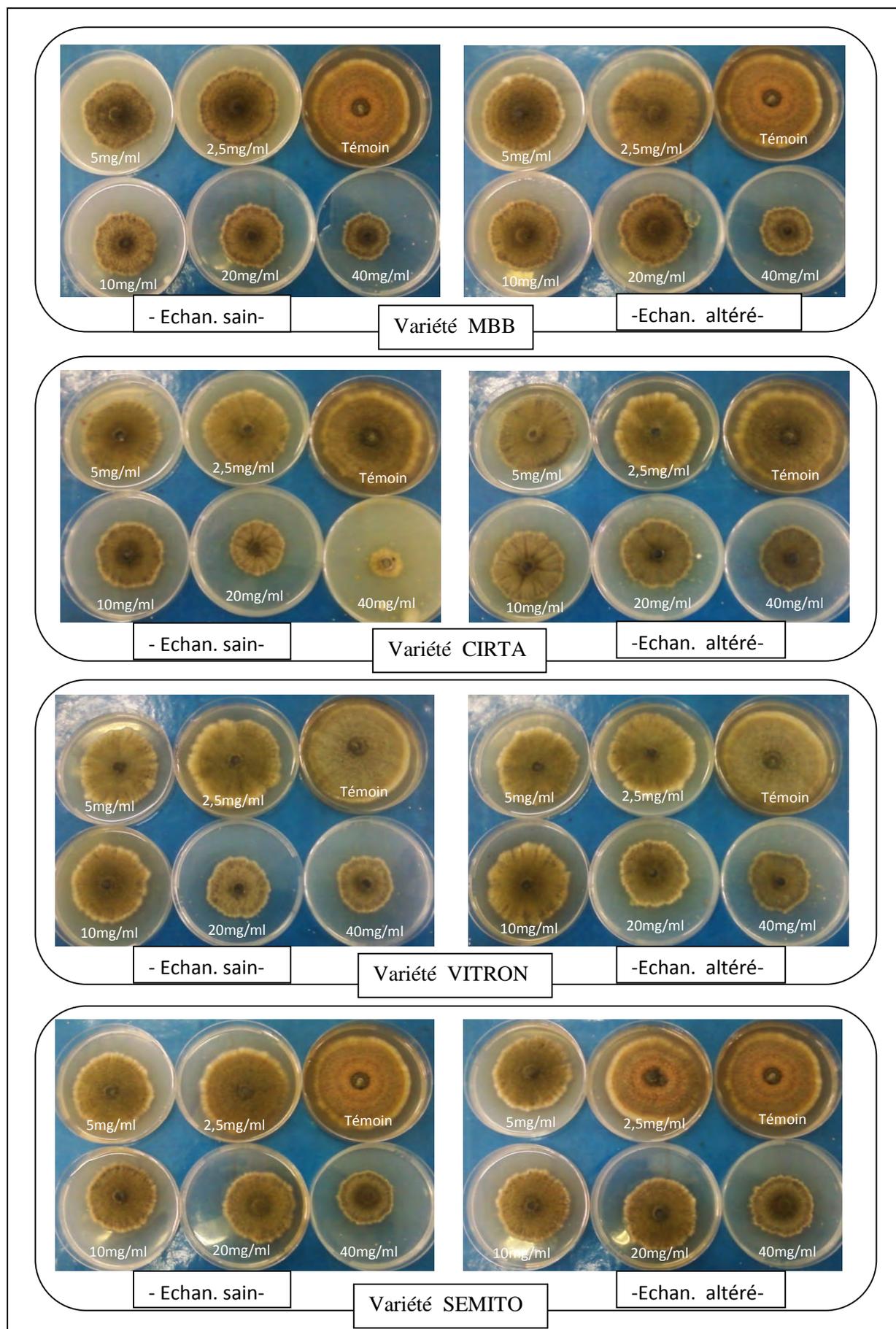
II.4. Mycélium aérien de quelques souches isolées de la variété SIMETO



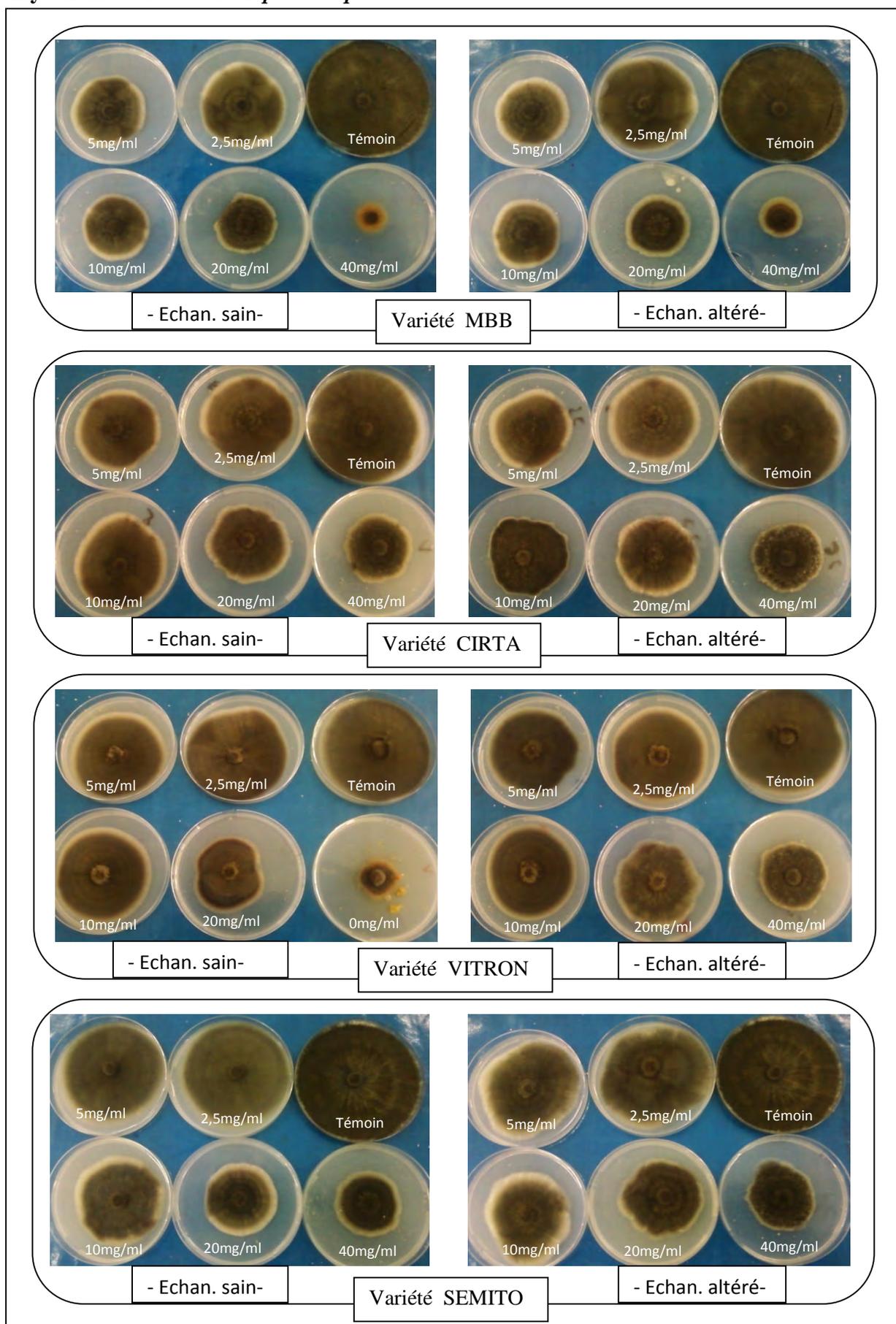
Annexe IV

IV.1. Effet des extraits polyphénoliques à différentes concentrations sur la croissance du mycélium de la souche *Alternaria* sp.

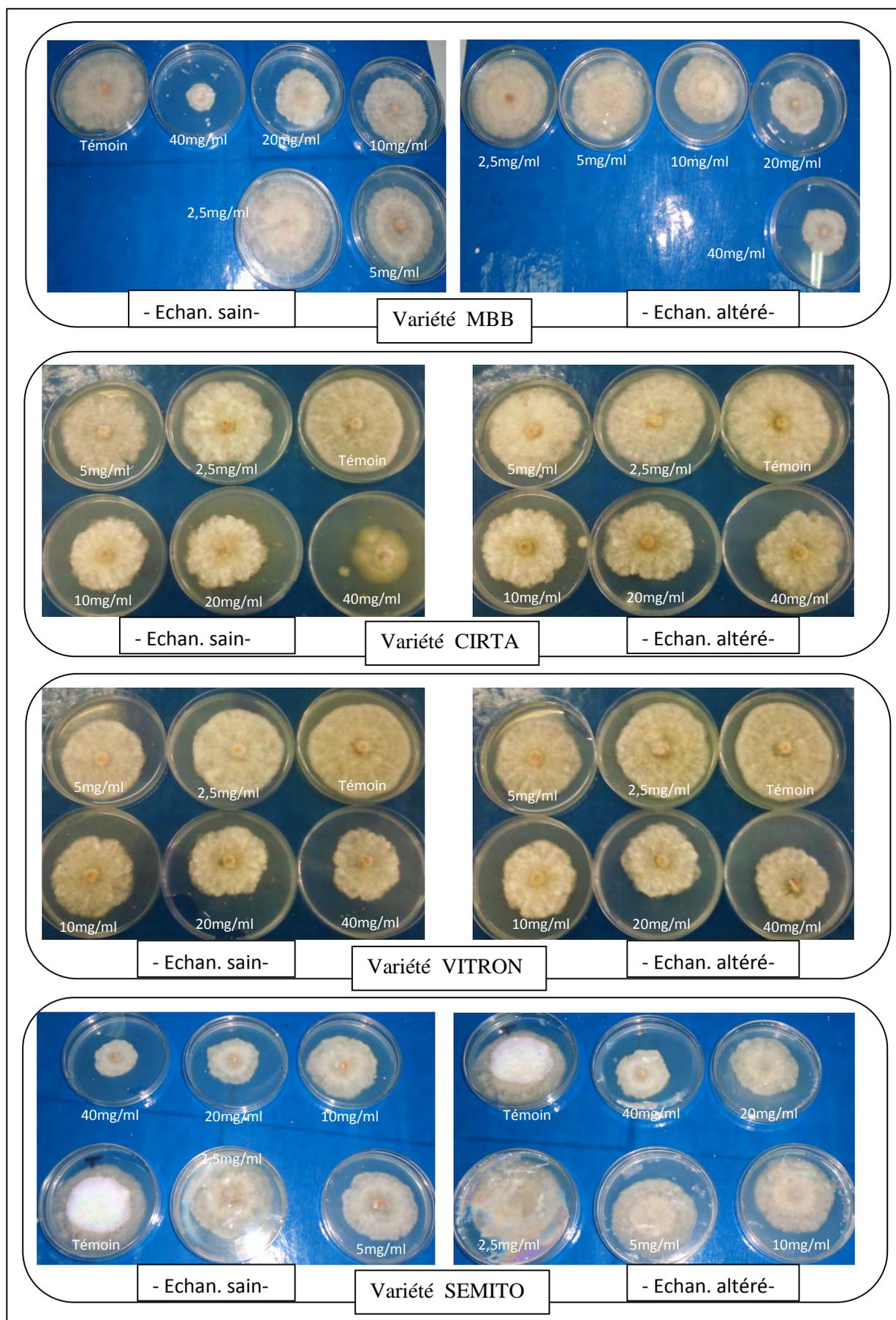
IV.2. Effet des extraits polyphénoliques à différentes concentrations sur la croissance du mycélium de la souche *Aureobasidium* sp.

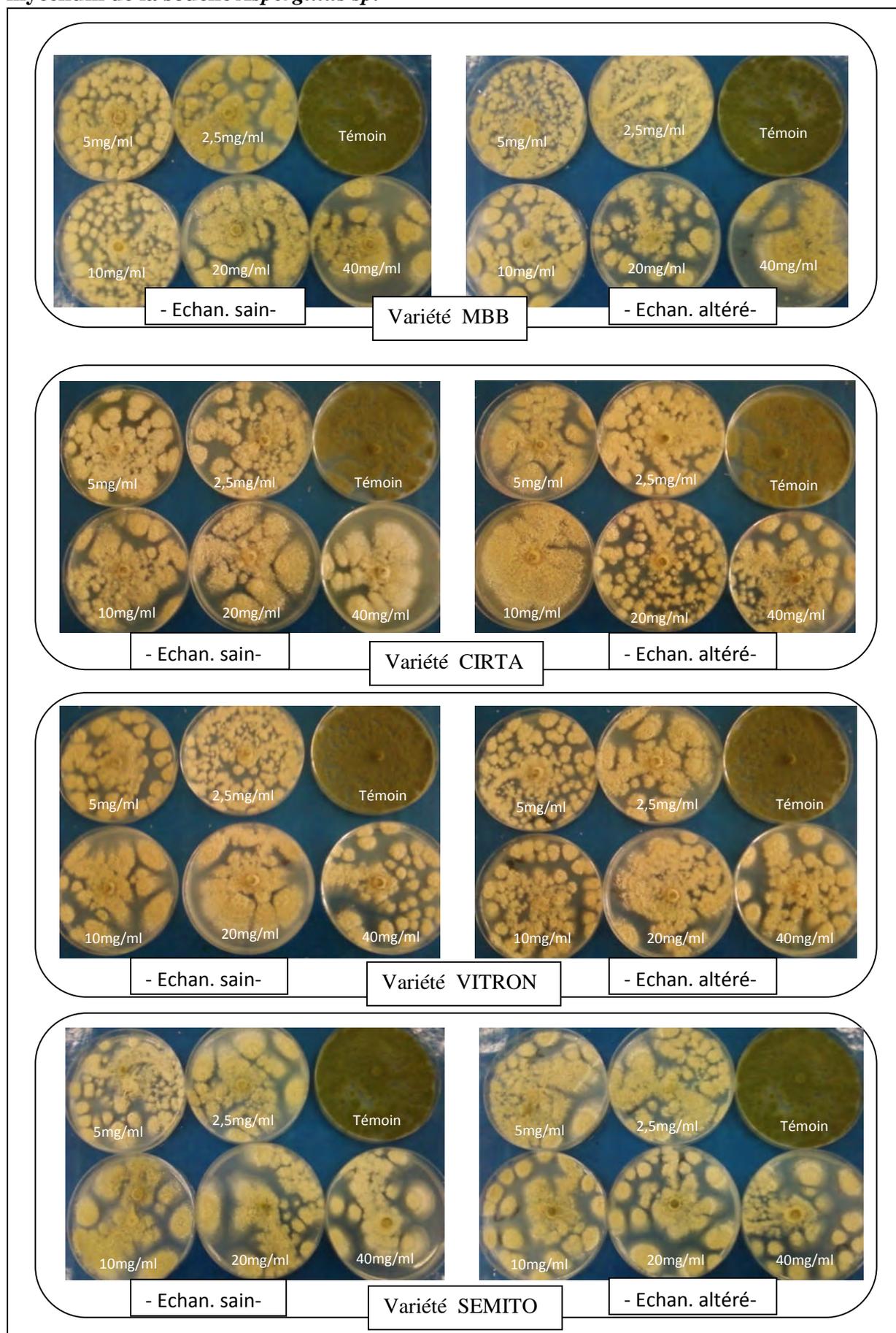


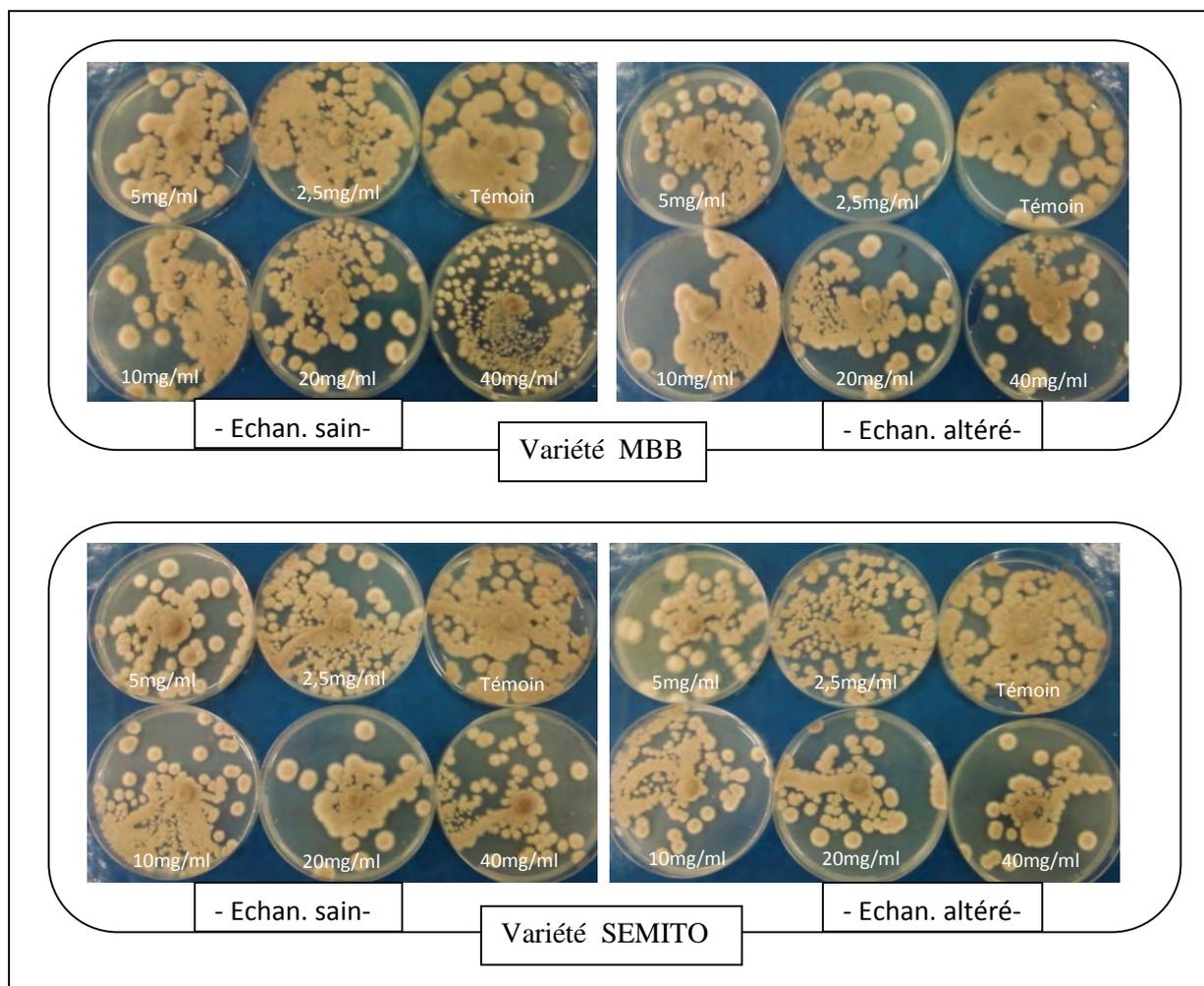
IV.3 Effet des extraits polyphénoliques à différentes concentrations sur la croissance du mycélium de la souche *Bipolaris sp.*



IV.4. Effet des extraits polyphénoliques à différentes concentrations sur la croissance du mycélium de la souche *Fusarium sp.*



IV.5. Effet des extraits polyphénoliques à différentes concentrations sur la croissance du mycélium de la souche *Aspergillus sp.*

IV.6. Effet des extraits polyphénoliques à différentes concentrations sur la croissance du mycélium de la souche *Penicillium sp.*

الموضوع : تأثير مادة البوليفينول على المقاومة بالإصابة من الفطريات عند حبوب القمح الصلب

طبيعة الشهادة : ماجستير في العلوم الغذائية

اختصاص : بيوتكنولوجيا غذائية

الملخص

التلوث بواسطة الكائنات الدقيقة تعتبر واحدة من الأسباب الرئيسية لتردي الحبوب المخزنة، وغالبا ما يتم التقليل من أهميتها. إن فطريات التخزين ، قد تؤدي إلى سلسلة من التغييرات ، مما يؤدي إلى الإلتلاف و فقدان على المستوى التكنولوجي، الصحي، التجاري والغذائي. تولى مركبات البوليفينول في السنوات الأخيرة اهتماما متزايدا في مجال الصناعات الغذائية. وقد أظهرت الأبحاث ارتباط هذه المركبات الفينولية في كثير من الأحيان بقدرة النبات على المقاومة ضد الكائنات الحية الدقيقة. يتم هذا العمل في هذا السياق، و يهدف إلى إظهار الترابط بين محتوى البوليفينول الكلي والإصابة بالفطريات في حبوب القمح لأربعة أصناف (MBB، CIRTA، SIMETO و VITRON). كما يركز هذا العمل أيضا على تقييم نشاط مادة البوليفينول الكلي المستخرجة من حبوب القمح ضد مجموعة من سلالات الفطريات على مستوى المختبر.

النتائج الرئيسية تظهر أولا أن العينات السليمة لديها تركيز أعلى من البوليفينول الكلي مقارنة مع العينات الغير سليمة. على العموم هناك فرق معتبر لمحتوى البوليفينول الكلي بين أصناف القمح المدروسة من جهة و بين العينات السليمة و العينات الغير سليمة من جهة أخرى. إضافة إلى ذلك، وجود كميات كبيرة من الفطريات في أصناف القمح على الرغم أنها تبدو العينات سليمة. قد وجدت ملوثة ، ونسبة التلوث أعلى في العينات الغير سليمة من العينات السليمة في جميع أصناف من القمح المدروسة. و قد أظهرت نتائج نشاط مضاد للفطريات لتركيزات مختلفة من مادة البوليفينول الكلي المستخرج من العينات السليمة و الغير سليمة من القمح تثبيط نمو الفطريات بطرق مختلفة. إن مستخلصات مادة البوليفينول الكلي في نفس التركيز ليس لديها نفس النسبة المئوية من تثبيط ضد سلالات الفطريات المختبرة. وعلاوة على ذلك، كشفت النتائج التي تم الحصول عليها بواسطة اختبار علاقة ارتباط سلبي كبير بين محتوى البوليفينول الكلي ونسبة التلوث. و انطلاقا من النتائج المحصل عليها ، يمكننا أن نستنتج أن نسبة عالية من مادة البوليفينول الكلي في حبوب القمح قد تحد من الإصابة من الفطريات.

الكلمات الدالة : الإلتلاف، أصناف القمح ، البوليفينول الكلي ، نشاط مضاد للفطريات، الارتباط، نمو الفطريات.

Name and first name: **ZOUAOUI Nassim**

Academic year : **2011-2012**

Theme: **Effect of polyphenols on the resistance to fungal infestation in durum wheat grain**

Nature of the diploma: **magister**

Option: **food biotechnology**

Abstract

Contamination by microorganisms is one of the major causes of deterioration of stored grain, and their importance is too often underestimated. Mold storage, may lead to a series of changes, resulting in loss of technological, commercial, hygienic and nutritional. The polyphenols are compounds generating in recent years a growing interest from the industrial food processing. Some studies have shown that the ability of a plant to resist attack by microorganisms is often correlated with phenolic content. This work is done in this context, it is the demonstration of correlation between the total polyphenol content and fungal infestation in wheat grains of four varieties (MBB, CIRTA, VITRON and SIMETO). This work also focuses on the evaluation of the in vitro antifungal activity of total polyphenols extracted from wheat grains.

The principal results show firstly, that the samples healthy have a higher concentration of total polyphenols compared to samples altered, a significant difference for total polyphenol content in the varieties of wheat analyzed and in the samples from healthy and altered wheat. Secondly, research molds from wheat varieties shows that despite the healthy appearance of some samples, they were found contaminated, the percentage of contamination is higher in the sample altered than in the sample healthy for all varieties of wheat analyzed. The results of the antifungal activity, for different concentrations of total polyphenols extracted from samples of healthy and altered wheat, showed inhibition of mycelial growth in different ways. The polyphenolic extracts have not the same percentage of inhibition at the same concentration vis-à-vis the mold strains tested. Moreover, the results obtained by the correlation test revealed a significant negative correlation between total polyphenol content and the percentage of contamination. With the rise of this study, we can conclude that the high content of total polyphenols in wheat grains appears to reduce the fungal infestation.

Key-word: alteration, wheat varieties, total polyphenols, antifungal activity, correlation, mold growth.

Thème : **Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain de blé dur**

Nature du diplôme : **Magister en sciences alimentaires**

Option : **Biotechnologie Alimentaire**

Résumé

La contamination par les microorganismes représente l'une des causes majeures d'altération des grains stockés, et leur importance est encore trop souvent sous-estimée. Les moisissures du stockage, peuvent amener à toute une série d'altérations, entraînant des pertes sur les plans technologique, commercial, hygiénique et nutritionnel. Les polyphénols sont des composés suscitant depuis quelques années un intérêt croissant de la part des industriels de l'agro-alimentaire. Des travaux ont montré que la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Ce travail est réalisé dans ce contexte, il vise la mise en évidence de corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'infestation fongique dans les grains de quatre variétés blé (MBB, CIRTA, VITRON et SIMETO). Ce travail met aussi l'accent sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des polyphénols totaux extraits des grains de blé.

Les principaux résultats obtenus montrent d'une part que les échantillons sains présentent une concentration plus élevée en polyphénols totaux par rapport aux échantillons altérés ; d'une manière générale il y a une différence significative pour la teneur en polyphénols totaux entre les variétés de blé analysés d'une part et d'autre part entre les échantillons sains et altérés des variétés analysées de blé. D'autre part, la recherche des moisissures à partir des variétés de blé indique que malgré l'apparence saine de certains échantillons, ils sont avérés contaminés ; le pourcentage de contamination est plus élevé chez l'échantillon altéré que chez l'échantillon sain pour toutes les variétés analysées de blé. Les résultats de l'activité antifongique *in vitro*, pour les différentes concentrations des polyphénols totaux extraits des échantillons sains et altérés de blé, montrent une inhibition de la croissance du mycélium de façon différente. Les extraits polyphénoliques n'ont pas le même pourcentage d'inhibition à la même concentration vis-à-vis des souches des moisissures testées. Par ailleurs, les résultats obtenus par le test de corrélation révèlent une corrélation hautement et négativement significative entre la teneur en polyphénols totaux et le pourcentage de contamination. A l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que la teneur élevée en polyphénols totaux dans les grains de blé semble réduire l'infestation fongique.

Mot-clé : altération, variétés de blé, polyphénols totaux, activité antifongique, corrélation, prolifération des moisissures.