

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mentouri-Constantine

Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires

(I.N.A.T.A.A)

Département de biotechnologie alimentaire

N ° d'ordre :

N ° de série :

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister en sciences alimentaires

Option : biotechnologie alimentaire

THEME

*Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation
fongique dans le grain d'haricot sec*

Présenté par : M^{lle} DJABALI Saliha

Soutenu le:

Devant le jury:

Président: Pr. KABOUCHE A.	Professeur	(I.N.A.T.A.A, UMC)
Promotrice: Dr. BARKAT M.	M.C.A	(I.N.A.T.A.A, UMC)
Examinatrice: Dr. BOUSHABA R.	M.C.A	(I.N.A.T.A.A, UMC)
Examinatrice: Dr. KHAROUB K.	M.C.A	(I.N.A.T.A.A, UMC)

Année universitaire 2011-2012

Remerciements

Nous remercions dieu tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail à terme.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mon enseignante et directrice de thèse **Dr. BARKAT M.**, je suis satisfaite de vos qualités exceptionnelles de bonne enseignante dont votre simplicité et votre amour du travail ont fait de vous une enseignante admirable dont l'exemple à suivre. Recevez ici, chère M^{me} mes sentiments de gratitude pour votre disponibilité, votre aide, votre patience au long de la réalisation et de la rédaction de ce travail.

Je tiens à remercier intensément **Pr. KABOUCHE A.** d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Je tiens à remercier très sincèrement **Dr. KHAROUB K.** non seulement pour avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon travail, mais aussi pour son soutien moral et professionnel pendant la thèse et toutes les années d'études.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à **Dr. BOUSHABA R.** d'avoir accepté de juger ce modeste travail avec bienveillance.

Un grand merci pour **Mme AYAT KAKI** qui m'a appris la méthode d'identification des moisissures. Je lui adresse tout mon respect pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à remercier toute l'équipe de post graduation, biotechnologie alimentaire et toutes les personnes avec qui j'ai partagé des bons moments. Je leur serai toujours reconnaissante pour leur aide et leurs conseils et je pense spécialement à **AYAD Rima** (pour sa gentillesse), **BOUGUERRA Ali** (pour son fidèle soutien), **GOMRI Med amine** (pour ses conseils et ses encouragements), **ZOUAOUI Nassim** (pour ses histoires et sa bonne humeur).

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Introduction	01
---------------------------	----

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01. Légumes secs

1. Généralités.....	03
2. Composition biochimique.....	04
3. Stockage des légumes secs.....	06
3. 1. Stockage traditionnel.....	06
3. 2. Stockage en sac.....	06
3. 3. Stockage en vrac.....	07
3. 4. Stockage en silos.....	07
4. Facteurs d'altération.....	07
4. 1. Facteurs physico-chimiques.....	07
4. 2. Facteurs biotiques.....	08
4. 3. Facteurs endogènes	10
5. Mécanisme de résistance de <i>Phaseolus vulgaris</i> aux moisissures	11
6. Amélioration variétale de l'haricot sec « <i>Phaseolus vulgaris</i> ».....	12
7. Conséquences des altérations sur la composition biochimique et la valeur marchande des légumes secs.....	13
7. 1. Dégradation des glucides.....	14
7. 2. Dégradation des lipides.....	14
7. 3. Dégradation des protéines.....	14
7. 4. Biosynthèse des mycotoxines.....	14
8. Méthodes de prévention et de lutte.....	15
8. 1. Lutte préventive.....	15
8. 2. Lutte curative.....	15

Chapitre 02. Moisissures

1. Caractères généraux.....	18
2. Classification.....	18

3. Mode et conditions de développement.....	19
3. 1. Mode de développement.....	19
3. 2. Conditions de développement.....	19
4. Reproduction.....	23
4. 1. Reproduction sexuée.....	23
4. 2. Reproduction végétative.....	23
5. Isolement.....	23
5. 1. Milieux de culture.....	24
5. 2. Milieux sélectifs.....	24
5. 3. Milieux différentiels.....	24
6. Identification des moisissures.....	25
6. 1. Identification morphologique.....	25
6. 2. Identification génétique.....	27

Chapitre 03. Composés polyphénoliques

1. Généralités sur les polyphénols.....	28
2. Principales classes des composés phénoliques.....	28
2. 1. Acides phénoliques (C ₆ -C ₁ ou C ₆ -C ₃).....	28
2. 2. Lignanes (C ₆ -C ₃) ₂	29
2. 3. Stilbènes (C ₆ -C ₂ -C ₆).....	29
2. 4. Flavonoïdes (C ₆ -C ₃ -C ₆).....	29
3. Activités biologiques des polyphénols.....	31
3. 1. Activité antioxydante.....	31
3. 2. Activité antimicrobienne.....	31
4. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols.....	33
4. 1. Effet des facteurs externes.....	33
4. 2. Stade physiologique.....	34
4. 3. Effet de l'espèce et de la variété.....	34
5. Composés polyphénoliques du grain d'haricot sec.....	35
6. Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques.....	36
6. 1. Extraction.....	36
6. 2. Dosage global.....	37
6. 3. Caractérisation et dosage des composés phénoliques par spectrophotométrie.....	38
6. 4. Séparations chromatographiques sur papier, couche minces et colonnes.....	38

6. 5. Séparations par chromatographie liquide à haute performance et par électrophorèse capillaire.....	39
6. 6. Détermination de la structure des composés phénoliques par les méthodes physico-chimiques.....	39

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal.....	41
1. 1. Présentation des variétés d'haricot sec.....	41
1. 2. Triage des grains.....	41
2. Méthodes.....	41
2. 1. Mesure du taux d'humidité des grains d'haricots secs.....	42
2. 2. Recherche et identification des moisissures.....	42
2. 2. 1. Isolement.....	42
2. 2. 2. Purification	42
2. 2. 3. Identification.....	43
2. 2. 4. Conservation des souches.....	43
2. 3. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux des grains	44
2. 3. 1. Echantillonnage.....	44
2. 3. 2. Extraction des polyphénols totaux	44
2. 3. 3. Dosage des polyphénols totaux	45
2. 4. Test du pouvoir antifongique des extraits polyphénoliques.....	47
2. 4. 1. Choix du solvant de récupération des extraits polyphénoliques.....	47
2. 4. 2. Essai antifongique.....	47
2. 4. 2. 1. Méthode du contact direct.....	48
2. 4. 2. 2. Méthode de dilution en milieu liquide.....	50
2. 5. Traitement statistique.....	51

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Taux d'humidité des échantillons d'haricot sec.....	52
2. Isolement et dénombrement des moisissures.....	53
3. Taux de contamination des échantillons d'haricot sec.....	54
4. Identification des genres.....	56

4. 1. Etude macroscopique.....	56
4. 2. Etude microscopique.....	57
5. Taux de contamination des échantillons d'haricot sec en fonction des genres isolés de moisissures.....	64
6. Evaluation de la teneur des polyphénols totaux.....	67
7. Corrélation entre le taux de contamination, l'humidité et la teneur en polyphénols totaux.....	69
8. Test du pouvoir antifongique.....	70
8. 1. Taux d'inhibition.....	70
8. 2. Détermination des index antifongiques (IA ₁₀₀).....	75
8. 3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI _s).....	75
8. 4. Concentrations fongistatique et fongicide	76
Conclusion et perspectives.....	79
Références bibliographiques.....	81
Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01. Superficie et production des légumes secs en Algérie (2006-2009) (DSASI, 2009).....	03
Tableau 02. Composition moyenne de quelques grains de légumineuses (g/100g du grain) (Arkoyld et Daughy, 1982).....	06
Tableau 03. Principales maladies des légumineuses (Cazaux, 2009).....	09
Tableau 04. Classification des moisissures (Meyer <i>et al.</i> , 2004).....	19
Tableau 05. Classification des familles des composés phénoliques (Garcia-Salas <i>et al.</i> , 2010).....	30
Tableau 06. Modes d’actions antimicrobiennes de quelques polyphénols (Cowan, 1999)....	32
Tableau 07. Activités biologiques de quelques composés polyphénoliques.....	33
Tableau 08. Analyse des différences par le test de Tukey entre les échantillons d’haricot sec pour le taux d’humidité ($p \leq 0,05$).....	52
Tableau 09. Taux de contamination de la variété rouge d’haricot sec.....	54
Tableau 10. Taux de contamination de la variété blanche d’haricot sec	55
Tableau 11. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété rouge saine d’haricot sec.....	58
Tableau 12. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété rouge contaminée d’haricot sec	59
Tableau 13. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété blanche saine d’haricot sec	60
Tableau 14. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété blanche contaminée d’haricot sec.....	61
Tableau 15. Caractères microscopiques des souches isolées des variétés blanche et rouge d’haricot sec.....	62
Tableau 16. Teneur en polyphénols totaux des extraits (mg EAG/g).....	67
Tableau 17. Analyse des différences par le test de Tukey entre les échantillons d’haricot sec pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0,05$).....	68
Tableau 18. Matrice de corrélation (<i>Pearson (n)</i>) entre les principales analyses effectuées sur les échantillons d’haricot sec (avec un seuil de signification de 0,05).....	69
Tableau 19. Récapitulation des index antifongiques (IA ₁₀₀) des extraits polyphénoliques des échantillons d’haricot sec	75
Tableau 20. Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) des extraits polyphénoliques d’haricot sec en milieu liquide.....	75

Tableau 21. Concentrations fongistatique (CFS) et fongicide (CF) en mg/ml des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur les souches isolées.....	76
Tableau 22. Quelques composés phénoliques actifs <i>in vitro</i> sur certaines mycètes.....	78

LISTE DES FIGURES

Figure 01. Structure du grain d'haricot sec (Daniel <i>et al.</i> , 1987).....	05
Figure 02. Modes de formation des conidies (Botton <i>et al.</i> , 1990).....	26
Figure 03. Structure chimique de quelques composés polyphénoliques présents dans les haricots communs (Reynoso <i>et al.</i> , 2006).....	36
Figure 04. Récapitulation des étapes d'extraction des polyphénols totaux	45
Figure 05. Récapitulation des étapes de dosage des polyphénols totaux.....	47
Figure 06. Préparation des dilutions des extraits polyphénoliques.....	48
Figure 07. Taux d'humidité des échantillons d'haricots secs.....	52
Figure 08. Taux de contamination fongique de la variété rouge saine d'haricot sec	64
Figure 09. Taux de contamination fongique de la variété rouge contaminée d'haricot sec....	64
Figure 10. Taux de contamination fongique de la variété blanche saine d'haricot sec.....	65
Figure 11. Taux de contamination fongique de la variété blanche contaminée d'haricot sec.	66
Figure 12. Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	67
Figure 13. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche <i>Alternaria sp.</i>	70
Figure 14. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche <i>Fusarium sp.</i>	71
Figure 15. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche <i>Moniliella sp.</i>	71
Figure 16. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche <i>Rhizopus sp.</i>	72
Figure 17. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche <i>Penicillium sp.</i>	73
Figure 18. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche <i>Aspergillus sp.</i>	74

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	Acide 2,2'- azino-bis -(3-ethylbenzthialozine-6-sulfonique)
ADN	Acide dé soxyribonucléique
AFPA	<i>Aspergillus flavus</i> et <i>parasiticus</i> agar
ARN	Acide ribo nucléique
ARN_m	Acide ribo nucléique m essenger
A_w	Activité d'eau
CCLS	Centre de c éréales et des l égumes secs
CF	Concentration f ongicide
CFS	Concentration f ongistatique
CLHP	Chromatographie liquide à h aute p erformance
CMI	Concentration m inimale i nhibitrice
DMSO	D iméthyle sulfoxyde
DPPH	1,1- d iphényl-2- p icrylhydrazyl
DRBC	D ichloran R ose B engal Chlortétracycline
DSASI	Direction des s tatistiques a gricoles et des s ystèmes d' i nformation
EC	Electrophorèse capillaire
ETI	Effector triggered i mmunity
GC	G rains supposés c ontaminés
GS	G rains supposés s ains
H₃PMo₁₂O₄₀	Acide phosphomolybdique
H₃PW₁₂O₄₀	Acide phosphotungstique
HBC	H aricot b lanc c ontaminé
HBCD	H aricot b lanc c ontaminé d ésinfecté
HBS	H aricot b lanc s ain
HBSD	H aricot b lanc s ain d ésinfecté
HRC	H aricot r ouge c ontaminé
HRCD	H aricot r ouge c ontaminé d ésinfecté
HRS	H aricot r ouge s ain
HRSD	H aricot r ouge s ain d ésinfecté
ITS1 et ITS2	I nternal T ranscribed S pacers 1 et 2
MAMP	M icrobial a ssociated m olecular p atterns
Mo₈O₂	Molybdène
Na₂ CO₃	Carbonate de sodium

NB-LRR	Nucleotide b inding leucine rich repeat
OGA	O xytétracycline G lucose A gar
OMS	O rganisation m ondiale de la santé
PAL	P hénylalanine a mmonia l yase
PAMP	P athogen a ssociated m olecular p atterns
PCR	P olymerase c hain r eaction
PDA	P otato d extrose a gar
PDB	P otato d extrose b roth
pH	P otentiel h ydrique
PHBC	P olyphénols d' h aricot b lanc c ontaminé
PHBS	P olyphénols d' h aricot b lanc s ain
PHRC	P olyphénols d' h aricot r ouge c ontaminé
PHRS	P olyphénols d' h aricot r ouge s ain
RMN	R ésonance m agnétique n ucléaire
UV	U ltra v iolet
W₈O₂₃	T ungstène
mg EAG/g d'extrait	mg équivalent a cide g allique par g ramme d'extrait

INTRODUCTION

Les grains des légumineuses notamment les haricots secs constituent, à côté des céréales, un apport alimentaire et une source de protéines pour l'homme dans de nombreuses régions du monde (Kellouche et Soltani, 2005). Malheureusement, outre les pertes de rendement enregistrées au champ, le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) subit des dégâts considérables pendant le stockage. La principale cause responsable de ces dégâts est la contamination par les moisissures. Elle cause non seulement une réduction directe du poids sec mais également une diminution des qualités technologique et nutritionnelle des grains. Les sources de contamination fongique sont nombreuses et les grains peuvent être contaminés par les champignons pendant la saison de croissance, ainsi que tout au long du processus de récolte jusqu'à l'entreposage (Bulter et Day, 1998).

Face à cette contamination, des produits chimiques ont été employés pour empêcher la croissance fongique (Phattayakorn et Wanchaitanawong, 2009). Cependant, l'OMS a interdit l'usage de certains fongicides chimiques, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité (Chahardehi *et al.*, 2010). De même, l'augmentation de la conscience du consommateur au sujet des risques de ces composés sur les produits alimentaires a incité la nécessité de rechercher d'autres agents de conservation, efficaces, naturels et sans danger pour la santé.

Certains travaux ont montré que la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Harborne, 1989). Les substances appartenant au groupe des composés phénoliques, très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure, ont été pendant longtemps très mal connues (Lugasi *et al.*, 2003). Considérées comme des substances secondaires, métaboliquement inactives, elles ne suscitaient que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion est entraînée de changer. Les recherches des dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils sont soumis, dans les tissus végétaux, à d'importantes variations quantitative et qualitative, témoignant ainsi d'une dynamique biochimique incontestable (Esekhiagbe *et al.*, 2009).

Certaines hypothèses ont été avancées, postulant que les plantes utilisent différents moyens pour se défendre des agressions de leur environnement que constituent les insectes, les bactéries, les moisissures, etc. Certains de ces moyens de défense font appel à ces composés chimiques qui interagissent avec le métabolisme de l'attaquant; étant alors intoxiqué et affecté, ce dernier

pourrait être découragé de poursuivre son attaque. L'accumulation des composés polyphénoliques pourrait donc être envisagée comme une réponse non spécifique à différents types d'agression (Chérif *et al.*, 2007). Cette hypothèse nous a incités à entreprendre une étude sur la corrélation entre la teneur en polyphénols totaux des grains de deux variétés d'haricot sec différentes par la couleur et la résistance à l'infestation fongique d'après les constatation de Esekhiagbe *et al.* (2009).

Les principaux objectifs de ce travail consistent à isoler et à identifier les moisissures contaminant les grains de deux variétés d'haricot sec, à évaluer la teneur en polyphénols totaux extraits à partir des grains et à mettre en évidence leur activité antifongique vis-à-vis des souches isolées.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit comme suite: outre l'introduction et la conclusion générale, il est structuré en trois parties. La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés trois chapitres; dans le premier chapitre nous apportons, principalement, les causes et les conséquences d'altération fongique des légumes secs et les moyens de lutte; le deuxième chapitre traite les moisissures, leur isolement et leur identification; le troisième chapitre élucide les principales classes des composés phénoliques, leurs activités biologiques et les principales méthodes de leur extraction et leur identification. Cet aperçu bibliographique nous a apparu un appui à la partie expérimentale et à l'interprétation de nos résultats.

La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés pour la mesure du taux d'humidité, l'isolement et l'identification des genres fongiques contaminant les deux variétés d'haricot sec, l'extraction et la quantification des polyphénols totaux à partir des grains d'haricot sec et le test de sensibilité des mycètes isolées vis-à-vis des extraits polyphénoliques.

La troisième partie expose les résultats obtenus suivis des discussions; elle récapitule l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux des variétés analysées d'haricot sec, 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 d'haricots secs et la résistance à l'infestation par les moisissures.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

En termes de surface et de quantité produite, les légumineuses constituent la seconde famille de plantes cultivées après les céréales (Gepts *et al.*, 2005). De la famille des *Fabaceae*, les légumineuses comptent environ 20 000 espèces qui sont caractérisées par des fleurs à cinq pétales et un ovaire supérieur qui forme une gousse remplie de grains riches en protéines (Cronk *et al.*, 2006).

Parmi les représentants de cette famille, on distingue: les protéagineux à grains (pois, haricot, féverole, pois chiche et lentilles), les protéagineux fourragers (luzerne et trèfle), et les oléoprotéagineux (soja et arachide) (Cazaux, 2009). Les légumes secs, qui sont les grains secs de légumineuses protéagineuses, se distinguant des grains de légumineuses oléagineuses par leur faible teneur en matière grasse (FAO et OMS, 2007).

En Algérie, les espèces de légumineuses alimentaires les plus cultivées sont: la lentille (*Lens culinaris* L.), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), le pois (*Pisum sativum* L.), la fève (*Vicia faba* L.) et le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (MA, 1998). Elles ont reçu beaucoup d'attention de la part des services agricoles pour augmenter les superficies et améliorer les niveaux de rendements (Tableau 01).

Tableau 01. Superficie et production des légumes secs en Algérie (2006-2009) (DSASI, 2009).

	2006/2007		2007/2008		2008/2009	
	Superficie (ha)	Production (Qx)	Superficie (ha)	Production (Qx)	Superficie (ha)	Production (Qx)
Fève/Féverole	31284	279735	30688	235210	32278	364949
Pois secs	9184	62430	7556	36175	8487	59692
Lentilles	873	5605	1309	10809	2588	26932
Pois chiches	20681	142940	20361	112110	22274	178404
Haricots secs	1394	9170	1040	5441	1616	11588
Gesses	94	950	197	1980	205	1325
Total	63510	500830	61151	401725	67448	642890

Bien que les légumineuses alimentaires cultivées aient bénéficié de quelques programmes de développement, la production nationale en légumes secs n'a pas connu l'amélioration escomptée, tant sur le plan de la superficie que production des grains. Toutes les espèces ont connu une instabilité de leur rendement. Les raisons de cette situation sont d'ordre technique mais aussi socio-économique (Drevon, 2009).

Au niveau mondial, les légumineuses à grains et de fourrage occupent près de 180 millions hectares représentant 12 à 15% de la surface des terres arables (Djebali, 2008). Les légumineuses à grains couvrent 33% des besoins humains en protéines alimentaires. Cette part est fournie, essentiellement, par les cultures du haricot, petit pois, pois chiche et fève (Vance *et al.*, 2000).

En plus des qualités alimentaires, les légumineuses jouent un rôle capital dans la préservation de l'environnement. L'azote est en effet l'élément nutritif le plus limitant de la production des plantes dans la plupart des écosystèmes naturels. Les légumineuses, via leurs capacités symbiotiques, peuvent contribuer à la colonisation des écosystèmes peu fertiles (Sprent et Parsons, 2000).

Outre ces bénéfices qu'elles entraînent pour l'alimentation et l'environnement, les légumineuses peuvent être utiles dans diverses industries, alimentaires, chimiques et pharmaceutiques (Graham et Vance, 2003).

2. Composition biochimique

Sur le plan biochimique et nutritionnel, les légumes secs sont caractérisés par :

- un taux de protéines compris entre 20 et 25 %; ces protéines sont surtout des globulines caractérisées par un déficit en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine);
- des glucides constitués d'amidon parfaitement digestible (45 à 50 %), et de fibres (8 à 18%); par contre, on y trouve aussi des α -galactosides (raffinose, stachyose, verbascose, etc.) non digestibles, hydrolysés et métabolisés par les bactéries intestinales en hydrogène, méthane et autres gaz responsables de la flatulence;
- la présence des facteurs antinutritionnels thermolabiles (les inhibiteurs de la trypsine et les lectines) et des composés phénoliques (Siret, 2000).

Ces éléments sont répartis dans toute la structure du grain (Figure 01).

- **Une enveloppe protectrice:** dont l'épaisseur, le poids relatif et la rigidité varient selon l'espèce. Elle est pauvre en eau et contient essentiellement des fibres et des composés phénoliques.
- **Deux cotylédons:** qui contiennent des protéines de réserves localisées dans des corps protéiques. On y trouve également des lipides, des glucides et plus particulièrement de l'amidon, des vitamines ainsi que des minéraux.
- **Le germe:** qui représente 1 à 3% du poids du grain contient des protéines à 40%, des lipides à 10% et des glucides à 45% (Cup et Legnaud-Rouand, 1992).

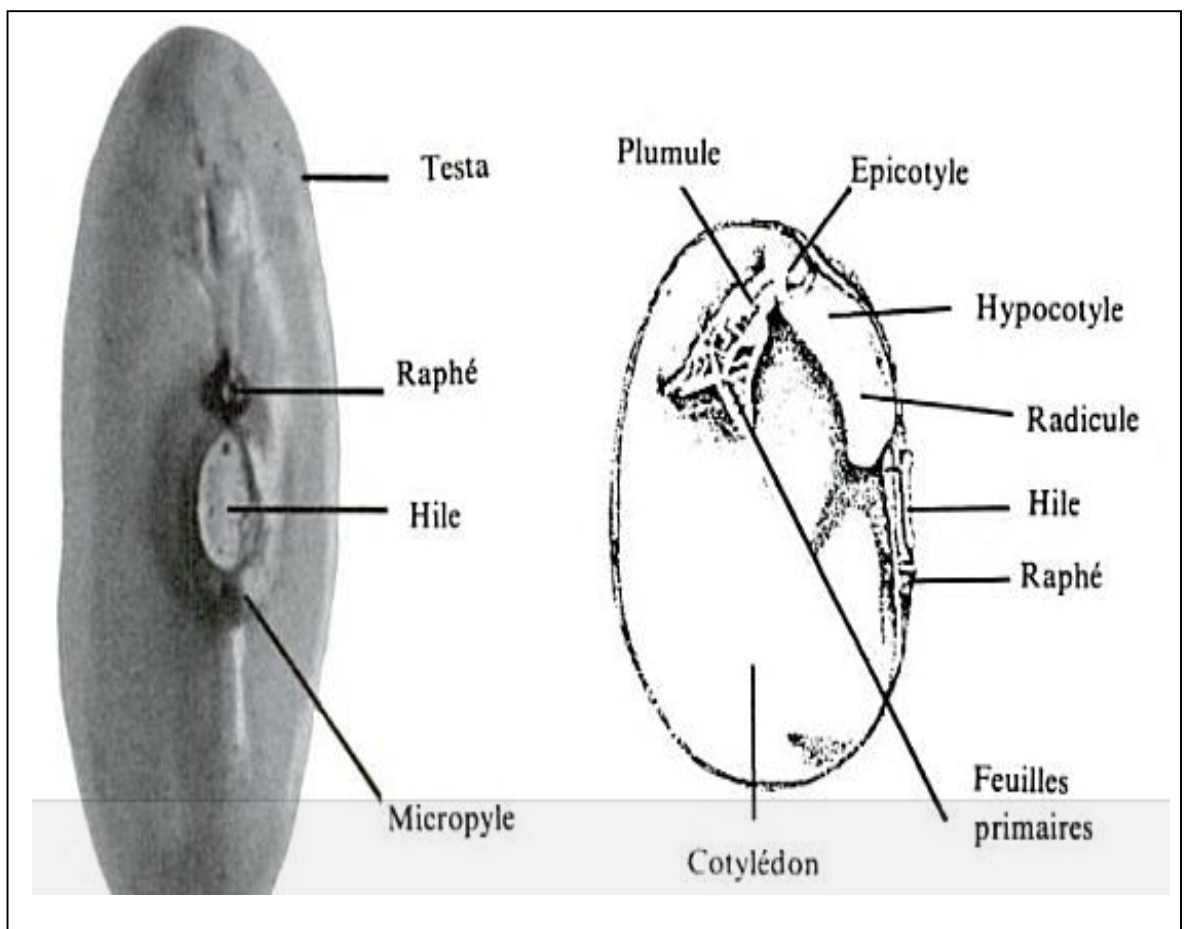


Figure 01. Structure du grain d'haricot sec (Daniel *et al.*, 1987).

Le tableau 02 résume la composition moyenne de quelques grains de légumineuses.

Tableau 02. Composition moyenne de quelques grains de légumineuses (g/100g du grain) (Arkoyld et Daughty, 1982).

Grains	Eau	Protéines	Lipides	Glucides	Fibres	Minéraux
Pois	9	23	1,5	60	8	3,5
Pois chiche	10	20	5	58	12	4
Fèves	8	23,8	0,2	6	15	0,4
Haricots	11	23	2	55	4	4
Lentilles	11	25	1	54	17	3

3. Stockage des légumes secs

On entend par stockage, la phase du système post-récolte, durant laquelle les produits sont conservés, de façon appropriée, afin de garantir la sécurité alimentaire des populations en dehors des périodes de production agricole. Pour atteindre cet objectif, il faut évidemment adopter des mesures visant à préserver, dans le temps, la qualité et la quantité des produits stockés (De Lucia et Assennato, 1992).

Les grains des légumes secs peuvent être stockés dans toutes sortes de conteneurs allant des gourdes en terre, des paniers, des cabanes, jusqu'aux grands silos en métal ou en ciment (Hayma, 2004).

3. 1. Stockage traditionnel

Dans ce type de stockage, les grains sont conservés dans des greniers de forme ronde ou carrée, généralement en terre plus ou moins additionnés de fibres végétales. L'inconvénient majeur de cette méthode est la très forte humidité et les eaux d'infiltration qui favorisent le développement des moisissures et le phénomène de fermentation bactérienne (Doumandji *et al.*, 2003).

3. 2. Stockage en sac

La solution du stockage en sacs au magasin est la plus fréquemment utilisée, car elle exige un investissement plus faible que le stockage en vrac. Malheureusement, les sacs sont déposés par terre et sont exposés aux rongeurs et aux insectes vecteurs des spores des moisissures (Jard, 1995).

3. 3. Stockage en vrac

Le stockage en vrac est encore peu répandu dans les pays en voie de développement, alors qu'il est généralisé dans les pays développés. Les grains en tas sont laissés à l'air libre sous des hangars ouverts à charpente métallique. Malheureusement, les contaminations sont possibles d'autant plus que dans ce type de construction, il demeure toujours des espèces entre les murs et les toits et le libre passage des insectes est permis (Doumandji *et al.*, 2003).

3. 4. Stockage en silos

Ce sont des enceintes cylindriques en métal ou en maçonnerie, couvertes sur les parois internes d'une couche d'aluminium pour éviter les phénomènes de condensation (Jard, 1995). Ces silos permettent de stocker plusieurs types des légumes secs ou de céréales, ils sont multi-produits (Duron, 1999). C'est une méthode efficace qui diminue les dégâts et limite l'attaque des ravageurs (Jard, 1995).

4. Facteurs d'altération

Pendant le stockage, les légumes secs sont menacés par:

4. 1. Facteurs physico-chimiques

4. 1. 1. Humidité

Parmi les facteurs de dégradation les plus importants, l'humidité joue un rôle prépondérant pendant le stockage (Multon, 1982). Dans toute masse de grains importants entreposés, non ventilée artificiellement, les différences de température entre différentes parties de la masse provoquent un déplacement de l'humidité et il en résulte souvent la formation de poche d'humidité intense, celle-ci constitue le milieu idéal pour le développement des champignons (FAO, 1984). La flore du stockage est composée d'espèces xérophiles adaptées à des substrats relativement secs (Feillet, 2000).

4. 1. 2. Température

La température de conservation est l'autre grand facteur influençant la longévité des grains (FAO, 1994); elle joue un rôle important en matière de conservation des grains, car elle favorise le phénomène de respiration et donc de dégradation des produits stockés. Elle influence également le développement des microorganismes et des insectes (Cruz et Diop, 1989). Les basses températures ralentissent l'activité des microorganismes à la surface des grains, de même

que celle des larves d'insectes lorsqu'elles se trouvent à l'intérieur des grains (Suszka *et al.*, 1994).

4. 1. 3. Durée du stockage

Il apparaît évident que plus la durée du stockage est longue plus les pertes de matière sèche dues simplement à la respiration des grains sont importantes. Les risques d'attaques par les différents prédateurs sont également accrus. Pour un stockage pluriannuel, il est important de rappeler que les grains doivent être très secs et dans un environnement favorable pour permettre leur conservation sur une grande période (Cruz et Diop, 1989).

4. 1. 4. Teneur en oxygène et en gaz carbonique

La teneur en oxygène et en gaz carbonique intervient sur la nature du métabolisme des insectes, des acariens, des microorganismes et des grains; elle intervient également au niveau des oxydations non enzymatiques et de certaines réactions enzymatiques (Multon, 1982). Le stockage des grains dans un milieu pauvre en oxygène provoque la mort des insectes, l'arrêt de développement des microorganismes et le blocage ou le ralentissement des phénomènes de dégradation des grains (FAO, 1994). Ce principe de conservation est mis en pratique dans les techniques dites de conservation sous atmosphère confinée ou sous atmosphère inerte (Cruz et Diop, 1989).

4. 2. Facteurs biotiques

Les principales causes des dégâts dans les lieux de stockage des légumineuses sont:

4. 2. 1. Insectes

Les insectes représentent les principaux vecteurs de spores de moisissures au champ et dans les lieux de stockage (Pfohl-Leszkowicz, 2001). La plupart se développent mieux à des températures de 25 à 30°C et à des humidités relatives de 70 à 80%. A des températures et humidités relatives inférieures ou supérieures, ils continuent à se développer, quoiqu'à un niveau moindre (Hayma, 2004). Il y a cinq espèces principales d'insectes qui s'attaquent aux haricots secs. Ce sont la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus*), la bruche du dolique (*Callosobruchus maculatus*), la pyrale indienne de la farine (*Plodia interpunctella*), la pyrale du tabac (*Ephesia elutella*) et la pyrale des amandes (*Cadra cautella*). La bruche du haricot et la bruche du dolique sont les plus destructrices (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

4. 2. 2. Moisissures

La biodétérioration microbienne des grains avant et après la récolte est un phénomène bien connu causant une perte significative jusqu'à 30%. La contamination par les moisissures est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes (Satish *et al.*, 2010). Les moisissures ou leurs spores sont presque toujours présentes au niveau du grain. Les spores ont besoin d'un milieu chaud et humide pour se développer et produire des hyphes. Les hyphes pénètrent dans le produit et le transforme partiellement en d'autres substances nécessaires à leur croissance (Hayma, 2004). Les genres et les espèces composant la mycoflore des grains des légumes secs sont rangés en trois grands groupes.

4. 2. 2. 1. Mycète de champ

Au champ, les légumineuses subissent l'attaque de beaucoup de moisissures. Les moisissures champêtres comprennent un grand nombre d'espèces appartenant notamment aux genres: *Erysiphe*, *Botrytis*, *Ascochyta*, *Mycosphaerella*, *Verticilium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, etc. (Djebali, 2008). Elles rassemblent les moisissures à tendance phytopathogène qui s'impliquent sur le grain avant la récolte (Godon et Loisel, 1997).

Parmi les maladies mycologiques des légumineuses (Tableau 03).

Tableau 03. Principales maladies des légumineuses (Cazaux, 2009).

Maladies	Agent pathogène responsable	Culture affectée
Ascochytose	<i>Ascochyta spp.</i>	haricot, lentille, pois chiche
Anthracnose	<i>Colletotrichum spp.</i> <i>Mycosphaerella pinodes</i>	haricot, lentille,
Tâches marron	<i>Botrytis spp.</i>	pois chiche, fève, lentille
Pourriture racinaire	<i>Fusarium spp.</i> <i>Phytophthora spp.</i> <i>Pythium spp.</i> <i>Rhizoctonia spp.</i> <i>Sclerotinia spp.</i>	la plupart des légumineuses à grain

4. 2. 2. 2. Mycète de stockage

Les principales moisissures du stockage comportent seulement quelques espèces d'*Aspergillus* qui sont adaptées à une vie sans eau libre et jusqu'à moins de degré les espèces de *Penicillium* (Christensen *et al.*, 1982) qui se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus* et à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées (Tabuc, 2007).

4. 2. 2. 3. Mycète 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*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Absidi* et *Mucor*. Les Mucorales avec les levures *Candida* et *Torulopsi* 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).

4. 3. Facteurs endogènes

4. 3. 1. Respiration

L'activité respiratoire du grain sec est faible, elle est due presque entièrement à la respiration du germe. Continue après la récolte et au cours de l'emmagasiner, elle s'accélère ou se ralentit en fonction de la température et de l'humidité relative ainsi que de la teneur en eau du grain. Si la teneur en eau dépasse 14%, la respiration apparente s'accroît peu à peu jusqu'à un seuil d'humidité critique au-delà duquel la respiration s'accélère rapidement et le grain a tendance à s'échauffer. Les sucres réducteurs sont convertis en CO₂ et en eau, ce qui conduit à une perte de sucres et de matière sèche (FAO, 1984).

4. 3. 2. Enzymes

La teneur en humidité nécessaire à l'activité de certains systèmes d'enzymes dans le germe joue un rôle important dans l'entreposage des grains. Par exemple, les α et β amylases des grains abîmés par germination attaquent les amidons et les transforment en maltose et dextrose. L'activité de l'amylase augmente dans le grain entreposé avec un taux d'humidité élevé (FAO, 1984). Alors que les enzymes lipolytiques sont les seules enzymes susceptibles d'être actives aux

faibles taux d'activité d'eau (A_w), zones qui sont précisément plus favorables aux oxydations chimiques (Thiam *et al.*, 1976).

4. 3. 3. Fermentation

Lorsque l'humidité est supérieure à 15%, il peut se produire une fermentation des hydrates de carbones avec production d'alcool ou d'acide acétique causant des odeurs aigres caractéristiques et une perte de la valeur nutritive (FAO, 1984).

5. Mécanisme de résistance de *Phaseolus vulgaris* aux moisissures

Les grains d'haricot sec sont confrontés à une grande variété de champignons (Macarde, 2004). On distingue trois types selon leur biologie trophique. Les biotrophes, les necrotrophes et les hemibiotrophes. Les agents biotrophes, comme, les champignons responsables de la rouille ou d'oïdium et certains oomycètes (Albugo), ont besoin de conserver les tissus de l'hôte pour s'alimenter et effectuer leur cycle de reproduction, les necrotrophes comme les champignons responsables de fontes (*Pythium*) ou de pourritures (*Botrytis*), eux, se développant en tuant les tissus sur lesquels ils prolifèrent. Enfin, les hemibiotrophes comme les champignons *Magnaporthe*, *Colletotrichum* et les oomycètes (*Phytophthora*), commencent principalement leur cycle comme des biotrophes, puis passent à un stade déterminé de leur cycle à une phase necrotrophe (Ramiro, 2009).

De nombreuses études se sont développées sur la compréhension des mécanismes de résistance et/ou de défense de l'haricot, dans l'espoir de diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires. Il dispose un arsenal de défenses pour contrer ses agents pathogènes. Les premières défenses sont les barrières physiques comme l'enveloppe protectrice (Macarde, 2004). La résistance induite, à travers l'accumulation de composés phénoliques et de phytoalexines, ainsi que l'activation des peroxydases, des polyphénoloxydases et des enzymes clés des voies des phénylpropanoïdes et des isoflavonoïdes, peut jouer un rôle crucial dans leur résistance. Aux quelles, s'ajoutent les acides cinnamique et férulique. Cependant, des efforts supplémentaires sont nécessaires pour fournir plus de preuves quant à l'accumulation de ces composés au bon moment, à la bonne concentration et au bon emplacement et pour élucider les gènes de régulation impliqués dans leur induction rapide et coordonnée en réponse à une agression fongique (Chérif *et al.*, 2007).

Malgré l'existence de barrières constitutives (paroi végétale, métabolites secondaires antimicrobiens, etc.) conférant une résistance générale efficace, l'induction de défenses plus adaptées à l'infection et à chaque type de parasite est souvent nécessaire (Ramiro, 2009). Il existe, essentiellement, deux voies dans le système immunitaire (Jones et Dangl, 2006). En premier lieu, la résistance basale est déclenchée par des récepteurs présents dans la membrane végétale capables de reconnaître des signaux moléculaires associés aux microbes ou agents pathogènes (MAMPs ou PAMPs pour “microbial ou pathogen associated molecular patterns”), comme exemple, la chitine (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Numberger et Kemmerling, 2006). Pour contourner la défense basale, les agents pathogènes synthétisent des protéines effectrices de virulence qui sont délivrées dans les cellules hôtes (Catanzariti *et al.*, 2007). Dans l'étape suivante du cycle évolutif, les cellules hôtes développent des moyens pour reconnaître les protéines effectrices et répondre à l'attaque par le biais d'un mécanisme de défense robuste et rapide. Ce deuxième front de défense est appelé l'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI pour effector triggered immunity) et est régulé par des protéines de type NB-LRR (Nucleotide Binding Leucine Rich Repeat) codées par des gènes de résistance (gènes *R*) (Tameling et Takken, 2008). Les effecteurs des champignons sont reconnus par des protéines NB-LRR et activent des réponses de défense semblables. La résistance de type ETI, basée sur les protéines NB-LRR, est efficace contre les champignons biotrophes ou hemibiotrophes, mais pas contre les necrotrophes qui tuent les tissus de la plante et empêchent donc toute réponse locale de résistance (Ramiro, 2009).

Actuellement, 15 gènes de résistance spécifique ont été caractérisés génétiquement chez le haricot commun. Huit gènes de résistance sont spécifiques à l'anthracnose (Ramiro, 2009).

Les essais réalisés *in vitro* et *in vivo* en utilisant différentes souches de *Phoma* laissent supposer l'intervention de deux enzymes, la chitinase et la glucanase, dans le mécanisme de résistance à l'ascochytose (Baudoin *et al.*, 2011).

6. Amélioration variétale de l'haricot sec « *Phaseolus vulgaris* »

L'amélioration variétale a connu depuis longtemps une attention particulière. L'objectif d'amélioration fixé est une combinaison entre le potentiel de production, l'adaptation aux différentes zones agro-écologiques, la tolérance aux stress biotiques et abiotiques et la qualité technologique (Feliachi, 2006).

Parmi les espèces utilisées pour l'amélioration de l'haricot commun, *Phaseolus polyanthus* occupe la première place par hybridation interspécifique, car elle possède un haut niveau de tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques (Baudoin *et al.*, 2011)

Les variétés améliorées étaient introduites en nombre limité, parmi lesquelles figuraient les lignées *Mexican 142*, *Red Wolaita*, *Awash*, *Melke*, *Beshbesh* et *ROBA-1* qui sont caractérisées par leur résistance aux maladies des tâches anguleuses du haricot, brûlures bactériennes communes, rouille, anthracnose et contre la mouche du haricot (CIAT, 2003).

En Algérie, les obstacles limitant la disponibilité des nouvelles variétés peuvent se résumer comme suit:

- inexistence d'établissements spécialisés dans la création variétale;
- lenteur pour l'homologation et la mise sur le marché de nouvelles variétés;
- réticence des établissements producteurs de semences à prendre en charge les nouvelles variétés, de peur de ne pouvoir les écouler sur le marché, sachant que les agriculteurs algériens adoptent difficilement de nouvelles variétés « systèmes de vulgarisation inadéquats »;
- faible apport de la recherche dans les domaines de la sélection et de production de semences (Feliachi, 2006).

7. Conséquences des altérations sur la composition biochimique et la valeur marchande des légumes secs

Les moisissures sont agressives et dégradantes seulement sous leur forme mycélienne. Sous la forme de spores, elles peuvent se disperser très largement et contaminer, mais sont inertes aussi longtemps que l'environnement ne permet pas leur développement. Il y a donc lieu de bien séparer les phénomènes de contamination par des spores, de la dégradation qui est la phase active due à du mycélium en expansion (Roquebert, 1997).

Les moisissures modifient sensiblement le substrat sur lequel elles vivent, ainsi un développement des moisissures sur les grains s'accompagne d'une modification de leur aspect, de leur odeur, de leur goût, d'une perte de matière sèche, d'une diminution de la valeur nutritive et d'une modification de leur composition (Cahagnier, 1996).

7. 1. Dégradation des glucides

Les légumes secs contiennent environ 60% de glucides qui sont représentés en majorité par l'amidon. La dégradation de ce dernier est un phénomène plus répandu et fait intervenir plusieurs types d'enzyme, le α -amylase qui a une action endomoléculaire conduisant à la formation de *D*-glucose, de maltose et d'une petite quantité de maltodextrine, le gluco-amylase qui libère des unités glucose à partir des extrémités non réductrices des polymères et le β -amylase qui a une action de type exomoléculaire donnant du maltose (Guiraud, 2003).

7. 2. Dégradation des lipides

Les lipides des grains, et notamment les triglycérides se révèlent particulièrement sensibles à la dégradation par les microorganismes. Les premières modifications biochimiques qui subissent les grains au cours du stockage mal conduit s'observent le plus souvent au niveau des lipides (Feillet, 2000). Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acides gras, grâce à des lipases, qui l'on rencontre chez les moisissures des genres *Rhizopus*, *Aspergillus* et *Geotrichum* (Guiraud, 2003).

7. 3. Dégradation des protéines

Certains légumes secs sont riches en protéines comme le cas des haricots. Grâce à leur enzymes protéolytiques (la protéase), les moisissures hydrolysent les protéines ce qui provoque la formation des acides aminés facilement utilisables par les moisissures. Il existe aussi des substances d'hydrolyse comme l'hydrogène sulfuré (H_2S) et l'ammoniaque. Cette dégradation provoque essentiellement l'émanation d'odeurs nauséabondes et une profonde modification de la consistance et du goût qui devient amer. Les principales espèces qui provoquent cette hydrolyse sont: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus niger* (Multon, 1982).

7. 4. Biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, élaborées par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. Elles se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum (Brochard et Le Bâcle, 2009). Une mycotoxine donnée n'est pas nécessairement spécifique à une seule moisissure; de même, une moisissure donnée peut produire plusieurs toxines différentes (D'halewyn *et al.*, 2002). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des acides aminés (Alcaloïdes de l'ergot, Acide aspergillique, etc.), des polycétoacides (Aflatoxines, Ochratoxine, Patuline, etc.),

des dérivés terpéniques (Diacétoxyscirpénol, Fusarénone, etc.) ou encore des dérivés d'acides gras (Fumonisines, Alternariol) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Selon FAO (1984), environ 25 % des denrées alimentaires sont contaminées par des mycotoxines qui entraînent plusieurs types de risques:

- **Toxicologiques:** Toxicité aiguë, augmentation de la prévalence de certains cancers, allergies, mais aussi des lésions très graves sur les reins, le foie, les gènes, le système immunitaire, l'appareil génital, ainsi que le système nerveux;
- **Technologiques:** Inhibition d'enzymes, résistances au traitement;
- **Economiques:** Les moindres performances des animaux qui consomment de la nourriture contaminée entraînent un rejet de la part des consommateurs.

D'après Pfohl-Leszkowicz (1999), les principaux types de mycotoxines rencontrés chez l'haricot sec sont : aflatoxines, ochratoxine, acide penicillique et stérigmatocystine.

8. Méthodes de prévention et de lutte

La lutte contre les moisissures peut se faire avant que ceux-ci n'attaquent les grains. On parle alors de lutte préventive. Parfois il est nécessaire de lutter directement contre ces dernières, et on parle de lutte curative.

8. 1. Lutte préventive

Cette lutte consiste en une hygiène rigoureuse des machines de récolte, des installations de manutention, des moyens de transport et des locaux de stockage. Il est important d'isoler les nouvelles récoltes de celles qui sont anciennes dans l'entrepôt (Kellouche et Soltani, 2005) et afin d'éviter, tout au moins limiter l'émigration des insectes vecteurs de spores vers les cultures, il convient de procéder au nettoyage, voire éventuellement à la désinfection des locaux dans lesquels étaient stockés les légumes secs. En culture, l'utilisation des variétés résistantes peut représenter une méthode de contrôle efficace (Goix, 1986).

8. 2. Lutte curative

8. 2. 1. Lutte chimique

Les dégâts les plus importants étant surtout occasionnés pendant la période de stockage. Plusieurs types de fongicides ont été utilisés dont les acides organiques de faible poids

moléculaire (acide propionique, acide acétique et acide formique) et leurs sels sont les plus employés (Magan et Olsen, 2004). Cependant, quelques mycètes peuvent utiliser ces acides comme source de carbone d'où la nécessité de rechercher des méthodes alternatives de conservation des grains (Tatsadjieu *et al.*, 2009). Dans le cas des grands lots de stockage, l'usage de fumigation est une technique efficace. Mais, malheureusement, parmi les substances chimiques utilisées, le bromure de méthyle et l'oxyde d'éthylène causent l'induction des phénomènes de résistance des genres toxigènes (Flamini et Luigi Cioni, 2003).

8. 2. 2. Lutte physique

Les agents physiques comme la température ou les radiations se révèlent très efficaces (Botton *et al.*, 1990). L'action létale de l'irradiation gamma sur les organismes vivants résulte de modifications chimiques, même quantitativement infimes, induites dans leurs molécules vitales. Les champignons producteurs de toxines sont plus sensibles que d'autres à l'irradiation. Cependant, beaucoup de facteurs pratiques, techniques aussi bien que biologiques, continuent à limiter l'utilisation d'irradiation gamma (Magan et Olsen, 2004).

8. 2. 3. Lutte biologique

L'emploi intensif et inconsidéré des fongicides chimiques dans les structures de stockage a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telles que la faune auxiliaire et l'apparition des microorganismes résistants (Magan et Olsen, 2004). Il est devenu donc indispensable d'appliquer une lutte ou un contrôle biologique. Les mécanismes par lesquels la croissance fongique et la production des mycotoxines peuvent être empêchées dans l'environnement concurrentiel incluent, la concurrence pour les nutriments et l'espace et l'induction des mécanismes de défense. Bien que le contrôle biologique ne semble pas encore être faisable sur les grains, un avantage important qui pourrait émerger des études sur les mycètes antagoniques serait la découverte des composés inhibiteurs à la production de mycètes et/ou de mycotoxine de stockage (Magan et Olsen, 2004).

8. 2. 4. Lutte par des produits naturels

Récemment, les résidus de pesticides sur les produits horticoles, particulièrement les fongicides utilisés à l'étape poste récolte, l'augmentation de la conscience du consommateur au sujet des risques de ces résidus sur les produits alimentaires et leur effet sur la santé humaine, l'apparition de la résistance des mycètes vis-à-vis certains fongicides chimiques, obligent les agriculteurs de rechercher de nouvelles substances et méthodes de conservation dont l'utilisation

des produits naturels tels que les huiles essentielles et les extraits polyphénoliques des végétaux (Shirzadl *et al.*, 2011). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés dans beaucoup des cas, puisque plusieurs paramètres doivent être considérés quand ces résultats sont comparés: le milieu de culture, la source botanique de la matière végétale et les techniques d'extraction (Lis-Balchin, 2002).

1. Caractères généraux

Les moisissures sont des organismes eucaryotes filamenteux (Reboux *et al.*, 2010). Certaines vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux et/ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques (Bouchet, 2005).

C'est un groupe hétérogène de champignons microscopiques, ubiquistes, caractérisés par:

- ❖ la nature chimique de la paroi cellulaire, constituée essentiellement de stérol (ergostérol) et de polysaccharides (β -glucanes et la chitine) (Chabasse *et al.*, 2002);
- ❖ la reproduction par spores sexuées ou asexuées (Tabuc, 2007);
- ❖ la présence de glycogène, comme substance de réserve (Tabuc, 2007);
- ❖ l'absence de la chlorophylle, donc des hétérotrophes (Tabuc, 2007).

Elles se retrouvent partout dans la nature et elles ont deux facettes, l'une bénéfique: *Penicillium camembertii* et *Penicillium roquefortii* dans la fromagerie; *Penicillium jensenii* ou *nalgiovense* en salaisonnerie (Boudra, 2002), utilisation en médecine pour la synthèse d'antibiotiques et utilisation en agriculture comme moyen de lutte contre les nématodes (Galtier *et al.*, 2005). Il est à noter aussi que la production de biomasse de *Penicillium chrysogenum* sert d'engrais ou d'aliment pour le bétail (Nguyen, 2007). L'autre facette nuisible est la réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, une baisse du rendement des récoltes et de graves problèmes sanitaires (Krogh, 1987).

Deux groupes de champignons toxigènes peuvent être distingués, le premier type est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant la mycotoxine sur plantes sénescences ou stressées: il est alors question de toxines de champs (Brochard et Le Bâcle, 2009). L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après la récolte, on les qualifie de toxines de stockage (Galtier *et al.*, 2005).

2. Classification

La classification des moisissures est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer *et al.*, 2004). Il s'agit d'un véritable règne égalant dans le rang celui des végétaux et des animaux. Ils partagent avec les animaux les capacités d'exporter les enzymes hydrolytiques qui décomposent les polymères utilisés en nutrition (Hawksworth *et al.*, 1995) et

avec les végétaux l'appareil végétatif « thalle » dépourvu de tiges, de racine et de feuilles (Taylor, 1993). Les plus grandes subdivisions caractérisant les moisissures sont récapitulées dans le tableau 04.

Tableau 04. Classification des moisissures (Meyer *et al.*, 2004).

Subdivisions	Classes	Ordres	Genres
<i>Zygomycotina</i>	<i>Zygomycètes</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Ascomycotina</i>	<i>Plectomycètes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Emmericella</i>
			<i>Neurospora</i>
	<i>Pyénomycètes</i>	<i>Spahaeriales</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>Hémiascomycètes</i>	<i>Endomycétales</i> (lévures)	<i>Fusarium</i> <i>Eremothecium</i> <i>Puccinia</i>
<i>Basidiomycotina</i>	<i>Hémibasidiomycètes</i>	<i>Urénidales</i>	<i>Aspergillus</i>
		<i>Ustilaginales</i>	<i>Moniliella</i>
<i>Deuteromycotina</i>	<i>Hyphomycètes</i>	<i>Moniliales</i>	<i>Penicillium</i>

3. Mode et conditions de développement

3. 1. Mode de développement

La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. Les régions apicales des hyphes sont les parties actives où s'effectue l'essentiel des réactions de synthèse et de dégradation du métabolisme primaire, elles sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant les enzymes et les précurseurs de synthèses de nouveaux polymères. Les produits du métabolisme secondaire, sont plutôt stockés en région subapicale dont les plus connus sont les pigments, les antibiotiques et les mycotoxines. Les hyphes sont appliqués sur le substrat ou parfois immergés dans celui-ci. Ils absorbent, à travers leur paroi, l'eau, les substances nutritives et les ions qui y sont contenu (Roqubert, 1997).

3. 2. Conditions de développement

Comme tout microorganisme, la croissance fongique est aussi dépendante d'un certain nombre de facteurs:

3. 2. 1. Facteurs nutritifs

Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote (Abdel Massih, 2007).

Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. Ces hydrates de carbone sont dégradés grâce à la glycolyse et le métabolisme aérobie (Boiron, 1996; Nicklin *et al.*, 2000).

L'azote représente, quant à lui, le second élément chimique le plus important du matériel cellulaire, composé majeur des protéines et des acides nucléiques. Il constitue en moyenne 12% du poids sec cellulaire (Scriban, 1993); non assimilable sous forme d'azote atmosphérique par les moisissures. Ces dernières métabolisent le nitrate, l'ammonium, l'urée et les acides aminés plus facilement assimilables (Botton *et al.*, 1990). Les peptides et les protéines ne sont utilisés par les moisissures qu'après leur dégradation (Botton *et al.*, 1990; Nicklin *et al.*, 2000).

Le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène sont des micronutriments (Nicklin *et al.*, 2000) nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc. Par ailleurs, le phosphore, le potassium, le calcium et le soufre représentent les macronutriments requis par les moisissures et sont convertis en divers composés après réduction (Boiron, 1996).

Diverses vitamines sont également d'une grande importance pour leur croissance, en particulier la thiamine et la biotine intervenant comme coenzyme lors des carboxylations (Rivière, 1975; Botton *et al.*, 1990).

3. 2. 2. Facteurs physico-chimiques

3. 2. 2. 1. Activité d'eau (A_w)

Les moisissures sont plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85 alors que les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des A_w voisines de 0,7 à 25°C; elles peuvent donc se développer sur les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours du stockage, les légumes secs et les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures, etc.). Par comparaison,

les *Fusarium* ne peuvent pas se développer que pour des A_w supérieures à 0,9. Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

3. 2. 2. 2. pH

Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH; elles se développent pour des pH compris entre 3 et 8, avec une croissance optimale entre 5 et 6 (Keller *et al.*, 1997). Certaines espèces telles que *Aspergillus niger* peuvent se développer jusqu'à 1,7. Cette faculté de se développer en milieu acide permet de les séparer des bactéries pour l'isolement (Larpent et Larpent, 1990).

3. 2. 2. 3. Température

Les moisissures sont généralement mésophiles, la croissance des hyphes est optimale entre 20 et 25°C. En dehors de cet intervalle de température, les hyphes se développent plus lentement. Il existe aussi des espèces psychrophiles, comme, *Penicillium expansum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*. Elles peuvent se développer, à des températures inférieures à 4°C. Ces espèces sont responsables des altérations d'aliments conservés au froid (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Les espèces thermotolérantes sont plus rares. C'est le cas d'*Aspergillus flavus*. La température optimale pour sa croissance est comprise entre 25 et 35°C, mais cette moisissure peut se développer bien dans un intervalle plus large (15-45°C) et parfois jusqu'à 50°C (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Il faut souligner que les moisissures sont, pour la très grande majorité, sensibles à une élévation de la température et un traitement de cuisson ou de pasteurisation permet le plus souvent de détruire les mycéliums ainsi que les spores fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

3. 2. 2. 4. Présence d'oxygène

Les moisissures sont des microorganismes aérobies. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs de 10 fois plus faibles (2,1%) que celle de l'atmosphère. En conséquence, certaines espèces de moisissures pourront se développer sur les denrées alimentaires conservées dans une atmosphère pauvre en oxygène. Par exemple, *Aspergillus flavus* peut se développer en présence de grandes concentrations d'azote 'N₂' (99%) ou de faibles concentrations d'oxygène 'O₂' (0,5%), mais une concentration de 80% de dioxyde de carbone 'CO₂' inhibe sa croissance. De même, le développement d'*Aspergillus ochraceus* est complètement inhibé par une teneur de 80% de CO₂ (Pfohl-Leszkowicz, 2001). *Penicillium*

verrucosum peut supporter des concentrations de CO₂ allant jusqu'à 25% sans modification significative de son développement; à partir de 25% de CO₂, la croissance du champignon est diminuée de 40% et de presque 75% dans une atmosphère contenant 50% de CO₂ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005). Par contre *Fusarium proliferatum* est, quant à lui, dépendant de la présence d'oxygène (Keller *et al.*, 1997) et l'absence d'O₂ réduit considérablement la biomasse fongique. Certaines espèces peuvent se développer en anaérobiose, c'est le cas du *Byssoschlamys* qui contamine les jus de fruits conservés par pasteurisation (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

3. 2. 2. 5. Lumière

La lumière favorise la maturation et la germination des spores. Les moisissures sont généralement indifférentes à l'action de la lumière. Toutefois, certaines espèces (les *Tuberales*) ne supportent pas la lumière et se développent dans des endroits obscurs (grottes). Inversement, d'autres se développent sur les versants de montagne ensoleillés en permanence ou dans les régions désertiques (les *Discomycetes*) (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

3. 2. 3. Facteurs biologiques

3. 2. 3. 1. Présence d'insectes

Les insectes, les acariens et les charançons, sont les principaux vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. Une infestation par les insectes prédispose les grains à une contamination par les moisissures et la production des mycotoxines (Brochard et Le Bâcle, 2009).

L'analyse des spores fongiques présentes sur la surface du corps des insectes et dans leurs intestins a révélé la présence de spores d'*Aspergillus flavus*, de *Penicillium brevicompactum*, de *P. chrysogenum*, de *P. cyclopium*, de *P. griseofulvum*, de *Botrytis cinerea*, de *Cladosporium herbarum*, et d'*Alternaria alternata*. Ces différentes espèces fongiques ont, ensuite, été retrouvées dans les échantillons analysés (Hubert *et al.*, 2004). Ceci pour montrer que les insectes sont loin de jouer un rôle mineur dans la contamination aux champs ou dans les zones de stockage.

3. 2. 3. 2. Interactions microbiennes

La compétition pour les nutriments et l'espace est un phénomène rencontré fréquemment dans le monde vivant. La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le

même milieu détermine des interactions entre les différentes espèces. Les conditions environnementales peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser d'autres. Par exemple, les *Mucoraceae*, caractérisés par une vitesse de croissance apicale élevée envahissent rapidement le milieu en inhibant le développement des espèces se développant plus lentement. La synthèse des substances toxiques (mycotoxines) et leur accumulation dans le milieu peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le développement de d'autres espèces fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

4. Reproduction

Les champignons se reproduisent de deux manières, par voie sexuée suite à la fusion de deux cellules gamétiques et par voie asexuée ou végétative (Champion, 1997).

4. 1. Reproduction sexuée

Les moisissures se reproduisent selon un cycle de reproduction sexuée (Bousseboua, 2005) qui implique la production d'organes sexués et de gamètes, la fusion des gamètes ou des organes suivie par la caryogamie et la méiose ainsi que le développement des organes de fructification (Larpent et Larpent, 1990). Ce type de reproduction permet la recombinaison des caractères héréditaires. La sexualité n'existe que chez certaines espèces, pour d'autres elle n'a jamais été mise en évidence, pour d'autres elle est inconstante ou rare (Guiraud, 2003).

4. 2. Reproduction végétative

Elle est beaucoup plus répandue que la précédente, et si elle ne fait pas intervenir de transformation génétique, elle joue un grand rôle dans la dissémination des espèces. Elle se fait, soit par la fragmentation du thalle, soit par la production de spores asexuées (Branger *et al.*, 2007). Chez les moisissures, plusieurs types de spores de reproduction végétative peuvent être produits (Branger *et al.*, 2007): arthospores (issues de la septation de la paroi cellulaire), sporangiospores (formées dans un sporange à l'extrémité d'un hyphe), conidiospores (produites à la périphérie des hyphes) et blastospores (formées par un bourgeonnement de surface d'une cellule végétative) (Bousseboua, 2005).

5. Isolement

La plupart des milieux naturels (air, sol, eau, matières premières alimentaires et produits manufacturés) renferment des microorganismes. Il n'existe pratiquement aucun milieu qui puisse résister à leur colonisation (Moreau, 1996).

La mise en évidence et l'isolement des moisissures sur un substrat contaminé s'effectuent sur des milieux de culture destinés à éliminer les bactéries et éventuellement, favoriser de façon spécifique certains contaminants (Cahagnier *et al.*, 1998). Les milieux d'isolement peuvent être classés en trois catégories:

5. 1. Milieux de culture

Les milieux de culture sont peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures, le milieu Czapek permet d'éliminer les bactéries grâce à son acidité, le milieu **oxytétracycline glucose agar** (OGA) et le milieu Sabouraud sont utilisés pour l'isolement des levures et des moisissures (Botton *et al.*, 1990). Dans le cas des espèces phytopathogènes, il est préférable d'utiliser des milieux à base de décoction végétale comme le milieu pomme de terre gélosé et le bouillon d'haricot gélosé (Guiraud, 2003).

5. 2. Milieux sélectifs

Ces milieux sont adaptés à la recherche d'une espèce ou d'un groupe d'espèces à écologie particulière et difficiles à mettre en évidence avec un milieu ordinaire. L'addition d'antibiotique à ces milieux est utilisée pour empêcher le développement des bactéries indésirables dans l'isolement des moisissures; parmi les antibiotiques utilisés, figurent: la pénicilline (5-20ppm), la gentamicine (50-60ppm), le chloramphénicol (50-100ppm), etc. L'utilisation des milieux inhibiteurs des moisissures envahissantes est nécessaire dans le cas de certains champignons tels que les *Mucor* et les *Rhizopus* qui envahissent rapidement les milieux d'isolement et de ce fait empêchent l'expression des autres espèces fongiques. Le milieu de Jarvis et le milieu **dichloran rose bengal chlortétracycline** (DRBC) peuvent être utilisés pour l'isolement sélectif et le dénombrement des moisissures des denrées alimentaires (Botton *et al.*, 1990).

5. 3. Milieux différentiels

Ces milieux sont utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles à mettre en évidence, en favorisant la croissance de certains genres ou espèces facilitant ainsi leur caractérisation; comme exemple; *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* isolés sur milieu *Aspergillus flavus* et *parasiticus* agar (AFPA) qui permet une caractérisation simple par la couleur jaune orangé de l'envers des colonies, milieu gélose à la créatine (CREA) permet d'identifier, par leur apparence, diverses espèces

d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, et de *Fusarium* sur gélose à la Dichloran-chloranphénicol (DCPA) ou sur gélose à l'iprodione et au dichloran (CZID) (Guiraud, 2003).

6. Identification des moisissures

L'identification de très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycologique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification (Tabuc, 2007).

6. 1. Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse des critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers constituent des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers, etc.) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, etc.) (Cahagnier et Molard, 1998).

6. 1. 1. Critères d'identification macroscopique

Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses; parfois peuvent avoir une apparence glabre, de relief plat ou plissé et dont la consistance et la taille sont variables. Les couleurs des colonies les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffusés dans le milieu de culture (*Fusarium*) (Botton *et al.*, 1990).

6. 1. 2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Mollard, 1998).

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium; le thalle peut être siphonné ou septé

(Badillet *et al.*, 1987), et les spores peuvent être endogènes ou exogènes dont la formation est thallique ou blastique (Figure 02) (Botton *et al.*, 1990).

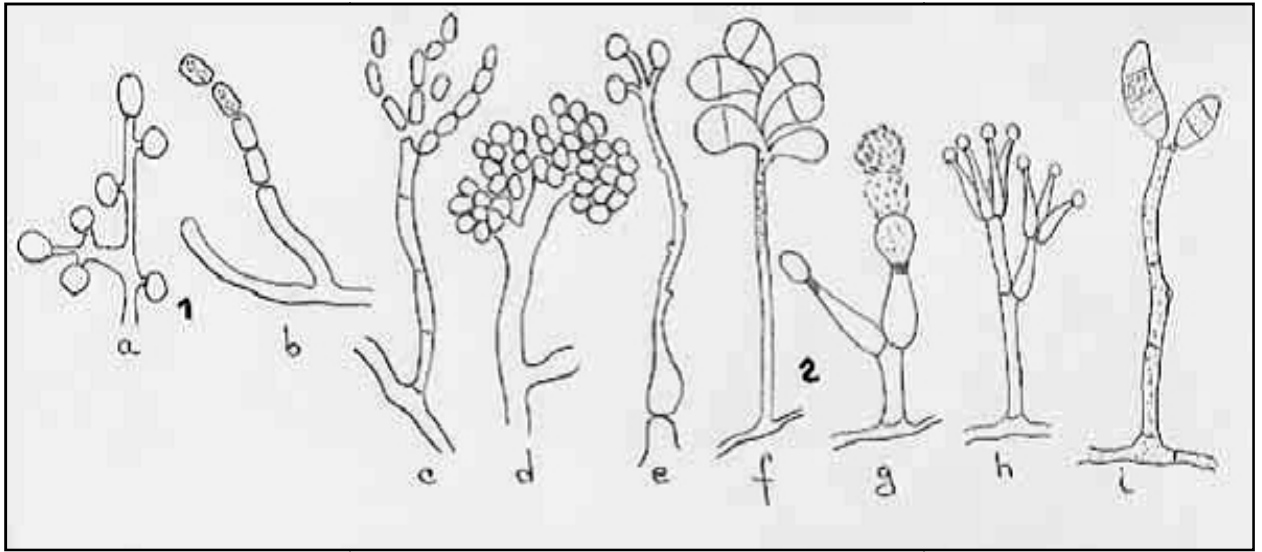


Figure 02. Modes de formation des conidies (Botton *et al.*, 1990).

1. Formation thallique : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthritique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : regressif (*Trichothecium*), g : annelidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue cinq groupes de spores : Amérospores (*Penicillium* et *Aspergillus*), Didymospores (*Trichothecium*), Phragmospores (*Curvularia*), Dictyospores (*Alternaria*), Scolécospores (*Fusarium*), regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène en grappe (*Beauveria*, *Trichothecium*), en masse (*Botrytis*), en têtes (*Acremonium*, *Trichoderma*), en chaînes basipètes (*Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*) ou en chaînes acropètes (*Cladosporium*, *Alternaria*) (Botton *et al.*, 1990).

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification des genres et des espèces. Elles peuvent être directement insérées sur les filaments végétatifs (*Acremonium*, *Fusarium*); bien distinctes des filaments végétatifs portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif; bien distinctes des filaments végétatifs portées par des conidiophores groupés (Tabuc, 2007).

La présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée et la présence des chlamydospores constituent un autre élément d'identification microscopique (Tabuc, 2007).

6. 2. Identification génétique

L'identification des espèces fongiques traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques macroscopiques et microscopiques, nécessite, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 18S ribosomale (région D1-D2) et des régions **internal transcribed spacers** 1 et 2 (ITS1 et ITS2) (Hinrikson *et al.*, 2005).

Les sondes d'oligonucléotide, dirigées vers la région ITS2 de l'ADN ribosomal de l'*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus*, et *A. versicolor* ont permis la différenciation de 41 isolats et n'ont donné aucune réaction faussement positive avec 33 espèces d'*Acremonium*, *Exophiala*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ou d'autres espèces d'*Aspergillus* (De Aguire *et al.*, 2004). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (Hageskal *et al.*, 2006).

1. Généralités sur les polyphénols

Le terme polyphénol a été introduit en 1980, en remplacement au terme ancien de tanin végétal et a été défini comme suit: composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes et la gélatine (Cowan, 1999).

Ce sont des métabolites secondaires des plantes (Garcia-Salas *et al.*, 2010) élaborés par la voie de shikimate et caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Charpentier et Boizot, 2006).

Ces phytonutriments sont responsables de la pigmentation (teinte des feuilles, couleur des fruits et des fleurs) (Serrano *et al.*, 2010) et jouent également un rôle dans la croissance, la reproduction et la protection des plantes contre les agressions pathogènes (Drewnoski *et al.*, 2000; Zem et Fernandez, 2005).

Ils sont communément subdivisés en phénols simples (C_6 : hydroquinone), acides phénoliques (C_6-C_4 : acide *p*-hydroxybenzoïque), coumarines (C_3-C_6 : acide *p*-coumarique), naphthoquinones (C_6-C_4 : juglone), stilbénoides ($C_6-C_2-C_6$: trans- resvératrol), flavonoïdes ($C_6-C_3-C_6$: kaempférol), isoflavonoïdes (daidzéine), et en anthocyanes (delphinidol). Les formes polymérisées sont les lignanes et les tanins condensés (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

2. Principales classes des composés phénoliques

Les auteurs soutiennent que plusieurs milliers de polyphénols ont été déjà identifiés et que plusieurs centaines sont présentes dans les parties comestibles des aliments (Tableau 05). Les catégories de polyphénols les plus courantes sont les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes et les flavonoïdes (Charles et Benbrook, 2005). Elles forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.*, 2005).

2. 1. Acides phénoliques (C_6-C_1 ou C_6-C_3)

Sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Parmi les acides phénoliques, figurent l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide férulique et l'acide gallique (Hale, 2003). Ils sont considérés comme substances phytochimiques

avec des effets antioxydants, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est faible et sont considérés, généralement, non toxiques (Psotová *et al.*, 2003).

2. 2. Lignanes (C_6-C_3)₂

Les graines de lin sont une source alimentaire importante de lignanes, bien que ces composés se retrouvent également en quantités moindres dans plusieurs autres céréales, dans les légumineuses et dans les légumes (Charles et Benbrook, 2005).

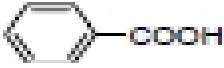
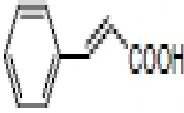
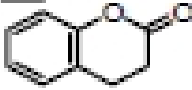
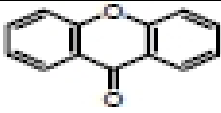
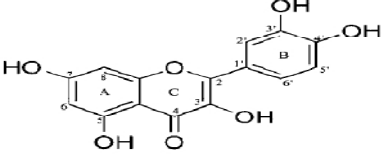
2. 3. Stilbènes ($C_6-C_2-C_6$)

Ne se retrouvent qu'en petites quantités dans l'alimentation humaine. Dans cette catégorie, le resvératrol est le polyphénol le plus couramment étudié (Manach *et al.*, 2004).

2. 4. Flavonoïdes ($C_6-C_3-C_6$)

La majorité des flavonoïdes ont une structure chimique semblable: deux anneaux aromatiques liés par trois atomes de carbone qui forment un composé hétérocyclique oxygéné. Les flavonoïdes se divisent en six sous-catégories : les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanols (catéchines et proanthocyanidines), les flavanones et les anthocyanidines (Charles et Benbrook, 2005).

Tableau 05. Classification des familles des composés phénoliques (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

Nombre de carbone	Classe	Structure chimique	Sources
C6	Phénols simples		Céréales, abricot, banane, chou-fleur
	Benzoquinones		
C6-C1	Acide benzoïque		
C6-C2	Acétophénone		
	Acide phénylacétique		
C6-C3	Acide cinnamique		Carotte, tomate, céréales, aubergine
	Coumarines		Carotte, céleri, citron, persil
C6-C4	Naphthoquinones		Abricot
C6-C1-C6	Xanthones		Mangue
C6-C2-C6	Stilbènes		Raisin
	Anthraquinones		
C6-C3-C6	Flavonoïdes		Largement distribués
(C6-C3) ₂	Lignanes		Seigle, blé
(C6-C1) _n	Tanins hydrolysables	Polymère hétérogène composé d'acides phénoliques et de sucres simples	Grenade, framboise
(C6-C3) _n	Lignines	Polymère aromatique fortement réticulé	

3. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols constituent une grande classe chimique. Ils disposent une extrême variété de structures et d'activités biologiques (Queiroz-Monici *et al.*, 2005).

3. 1. Activité antioxydante

Actuellement, les études portant sur les polyphénols connaissent un grand essor. Une grande partie d'entre elles a été réalisée afin d'informer et de sensibiliser les consommateurs et les pouvoirs publics sur l'intérêt des fruits et légumes riches en polyphénols, antioxydants naturels aux forts potentiels antioxydants (Bouayed *et al.*, 2007).

La capacité antioxydante est le principal rôle physiologique attribué aux polyphénols (Navarro *et al.*, 2008). Halliwell et Gutteridge (1995) définissent un antioxydant comme « une substance qui, à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement son oxydation ». L'action antioxydante d'un composé phénolique peut être issue d'une combinaison d'évènements chimiques, dont l'inhibition enzymatique, la chélation de métaux ou encore la donation d'hydrogène et l'oxydation en un radical stable (Parr et Bolwell, 2000).

La capacité antioxydante peut être évaluée comme le potentiel à piéger des radicaux libres, en mesurant directement l'inhibition du radical lors de l'ajout du composé antioxydant. Les tests d'évaluation utilisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), radical coloré stable, ou l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthialozine-6-sulfonique) (ABTS), dont le radical coloré peut être généré par réaction enzymatique (Rice-Evans *et al.*, 1995). La décoloration du radical après addition de l'antioxydant est alors mesurée (Parr et Bolwell, 2000).

3. 2. Activité antimicrobienne

Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action diverses et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de microorganismes procaryotes et eucaryotes (bactéries et champignons) (Cowan, 1999).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe (Hadi, 2004). Le tableau 06 expose quelques hypothèses avancées par Cowan (1999).

Tableau 06. Modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols (Cowan, 1999).

Différents composés phénoliques	Exemples	Mécanisme
Phénols simples	Catéchol	} Privation du substrat.
	Epicatechine	
Acides phénoliques	Acide Cinnamique	} Interruption de la fonction membranaire.
Quinones	Hypericine	
		} Destruction de la paroi cellulaire et désactivation des enzymes.
Tanins	Ellagitannine	Liaison aux protéines.
		Inhibition de l'enzyme.
		Privation du substrat.
		Complexe avec la paroi cellulaire.
		Interruption de la fonction membranaire.
		Complexe avec les ions métalliques.
Coumarines	Warfarine	Interaction avec l'ADN des eucaryotes (activité antivirale).

3. 2. 1. Activité antibactérienne

Parmi les polyphénols antibactériens, les flavonoïdes bloquent la synthèse des acides nucléiques d'*Escherichia coli*. Ils ont un pouvoir inhibiteur sur les différentes fonctions de la membrane cytoplasmique en réduisant la fluidité de la couche interne et externe. Ces composés ont une activité bactéricide et bactériostatique en perturbant les métabolismes énergétiques (Jones *et al.*, 1994).

3. 2. 2. Activité antifongique

La majorité des polyphénols ont une activité antifongique très puissante. Orturno (2005) a démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Citrus parasidi*, et de *Citrus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. Aussi, les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.* ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida zeylanoïdes* (Batawita, 2002).

Le tableau 07 regroupe quelques propriétés attribuées aux polyphénols.

Tableau 07. Activités biologiques de quelques composés polyphénoliques.

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides Phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Antibactérienne	(Cowan, 1999).
	Antifongique	(Lattanzio <i>et al.</i> , 2001)
	Antioxydante	(Bouayed <i>et al.</i> , 2007).
Proanthocyanidines	Antifongique	(Bahorun <i>et al.</i> , 1996).
	Antioxydante	(Brownlee <i>et al.</i> , 1992).
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydante	(Macheix <i>et al.</i> , 2005).
		(Macheix <i>et al.</i> , 2005).

4. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols

4. 1. Effet des facteurs externes

Le métabolisme phénolique est particulièrement sensible à l'action des facteurs externes comme la lumière, la température, les microorganismes pathogènes et les traitements appliqués par l'homme (Dinelli *et al.*, 2006).

4. 1. 1. Lumière

L'importance de la lumière (spectre visible mais aussi UV contenus dans le rayonnement solaire) sur l'accumulation des anthocyanes se résume par l'intervention de deux paramètres: d'une part l'intensité du flux lumineux et d'autre part la nature des radiations constitutives. Elle agit directement, par l'intermédiaire des radiations bleues et rouges et du pigment végétal phytochrome sur l'activation du promoteur des gènes phénylalanine ammonia lyase (*PAL*), ce qui se traduit alors par la transcription des ARNm puis la formation de la protéine enzymatique (enzyme du métabolisme) (Hahlbrock *et al.*, 1995).

4. 1. 2. Température

La température est également un facteur de régulation de l'expression du métabolisme phénolique, souvent en interaction avec la lumière. Ainsi, un abaissement de la température associé à un traitement lumineux adéquat induit fréquemment une accumulation des anthocyanes. Là encore, la régulation pourrait intervenir au niveau de *PAL* elle-même, des inhibiteurs de l'enzyme pouvant être mis en place sous l'effet des températures élevées. Des perturbations du métabolisme phénolique peuvent quelques fois apparaître à la suite de

traitements d'organes végétaux au froid, conduisant alors à des brunissements (Rhodes *et al.*, 1981).

4. 1. 3. Microorganismes pathogènes

La contamination du végétal par des microorganismes pathogènes entraîne également une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, correspondant à la mise en place de mécanismes de défense de la plante (Dixon et Paiva, 1995).

4. 1. 4. Traitements appliqués par l'homme

Certains traitements (application de fertilisants, irradiations, etc.) peuvent moduler la teneur de la plante en composés phénoliques, soit au cours de la croissance, soit au cours de la conservation des organes végétaux. Les conséquences sont souvent prévisibles car la réponse peut être très variable d'une espèce à l'autre et en fonction des doses appliquées et des durées de traitements. De profondes modifications de l'équipement phénolique interviennent également lorsque les organes végétaux sont soumis à des procédés technologiques destinés à les transformer (blanchiment, cuisson, etc.) (Macheix *et al.*, 2005).

4. 2. Stade physiologique

Les teneurs en composés phénoliques des organes végétaux sont également variables en fonction du stade physiologique. A l'exception des anthocyanes, la concentration en composés phénoliques se décroît au cours de la croissance et de la maturation. Chaque groupe de composés phénoliques peut évoluer au cours de la croissance selon une cinétique qui lui est propre, ce qui conduit alors à des proportions variables des différents composés en fonction du stade physiologique atteint (Macheix *et al.*, 2005).

4. 3. Effet de l'espèce et de la variété

L'expression du métabolisme phénolique dans la plante est la traduction du patrimoine génétique propre à chaque espèce. La nature et la teneur en composés phénoliques accumulés sont donc d'abord une caractéristique de l'espèce végétale considérée. En effet, il est possible de caractériser les différentes variétés d'espèces par une véritable empreinte phénolique qui peut être utilisée pour la certification de variétés nouvelles obtenues par hybridation. Ces mêmes approches peuvent permettre de déceler certaines fraudes dans des produits de l'agroalimentaire (Fleuriet et Macheix, 2003).

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on peut également constater des différences très importantes entre les diverses variétés ou cultivars, quelquefois plus importantes qu'entre les espèces elles mêmes. L'exemple des haricots secs est déjà significatif au niveau des anthocyanes: certains variétés (les haricots rouges) sont très riches au moment de la maturité alors que d'autre (les haricots blancs) en sont complètement dépourvues (Leighton *et al.*, 1992).

5. Composés polyphénoliques du grain d'haricot sec

Les légumes secs, sont riches en composés phénoliques totaux avec une teneur variable entre 300 mg à 17 g.kg⁻¹ (Fleuriet et Macheit, 2003). Pour les haricots secs, la couleur du grain est déterminée par la présence des composés polyphénoliques, localisés principalement dans l'enveloppe (11% du poids du grain) avec une baisse voire négligeables quantités dans les cotylédons (Gonzalez de Mejía *et al.*, 1999). Les composés polyphénoliques principaux sont des flavonoïdes, comme, les glycosides de flavonol, les anthocyanines, et les tanins condensés (proanthocyanidines) qui forment le groupe le plus largement distribué dans les haricots (Aparicio *et al.*, 2005) principalement dans la cosse du grain avec une teneur de 9,4 à 37,8 mg équivalent de catéchine/g (Beninger et Hosfield, 2003). Généralement, les composants flavonoïques ont montré des différences distinctes. Les haricots noirs contiennent principalement les 3O-glucosides de delphinidine, de pétunidine et de malvidine, alors que les haricots pinto contiennent le kaempferol et ses dérivés 3O- glycosides. L'haricot nain rouge léger contient des traces de la quercétine 3O-glucoside et ses malonates, mais le rose et les nains rouge foncé contiennent les diglycosides de la quercétine et du kaempferol. Les petits haricots rouges contiennent le kaempferol 3O-glucoside et le pelargonidin 3O-glucoside, alors qu'aucune flavonoïde n'a été détectée dans les haricots alubia, canneberge, grand nordique, et flageolets (Figure 03) (Lin *et al.*, 2008).

D'après les travaux de Luthria et Pastor-Corrales (2006); Granito *et al.* (2007), la teneur en acide phénolique totale extrait par HPLC était de 31.2 mg/100 g dont l'acide férulique était l'acide phénolique le plus abondant suivis par l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique qui ont été extraits à partir des échantillons d'haricot analysés.

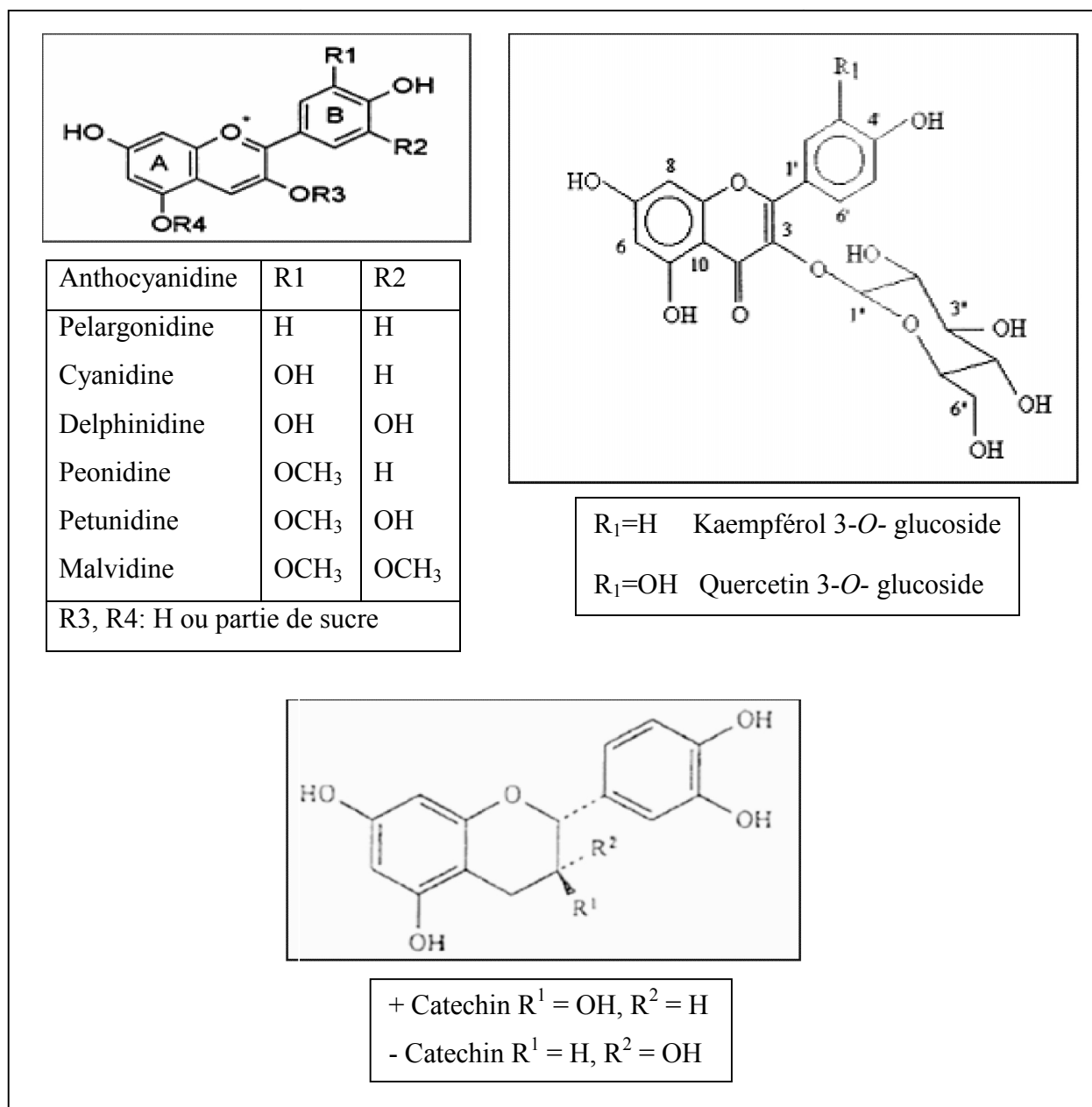


Figure 03. Structure chimique de quelques composés polyphénoliques présents dans les haricots communs (Reynoso *et al.*, 2006).

6. Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques

6. 1. Extraction

Le procédé d'extraction est systématiquement effectué en utilisant un solvant organique polaire tels que l'éthanol, l'acétone ou le méthanol (Ross *et al.*, 2009).

6. 1. 1. Extraction des phénols simples

La plupart des phénols simples peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau (80/20, v/v). Comme ils sont facilement oxydables, il est recommandé de travailler

à une température de 0 à 4°C et d'assurer une protection en ajoutant un agent réducteur (acide ascorbique ou méta bisulfite de sodium) au milieu d'extraction ce qui permet par ailleurs d'éviter l'hydrolyse d'hétérosides phénoliques fragiles lors de l'extraction. Après élimination de l'alcool par évaporation sous vide, il est nécessaire de purifier l'extrait global ainsi obtenu, d'abord en éliminant les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (extraction à l'éther de pétrole), puis en extrayant les composés phénoliques avec solvant de polarité intermédiaire comme l'acétate d'éthyle. La plupart des phénols se trouvent alors dans ce solvant, qu'il est ensuite aisé d'éliminer sous vide afin de transférer finalement dans le méthanol la fraction phénolique correctement purifiée (Macheix *et al.*, 2005).

6. 1. 2. Extraction des anthocyanes et des flavonoïdes apolaires

Les pigments anthocyaniques sont extraits par un mélange méthanol/HCl. A l'opposé, certains flavonoïdes apolaires, doivent être extraits avec des solvants plus apolaires, comme le chloroforme ou l'hexane (Macheix *et al.*, 2005).

6. 1. 3 Extraction des formes condensées

Les formes condensées de composés phénoliques posent également des problèmes d'extraction. Si les tanins sont encore correctement extraits par des mélanges acétone/eau, ce ne peut être le cas pour les phénols insolubilisés au niveau des parois pecto-cellulosiques et dans la cutine ou la subérine. On peut alors avoir recours à des hydrolyses chimiques ou enzymatiques des parois cellulaires, permettant de libérer les composés phénoliques avant de les analyser et de les doser. Dans les cas extrêmes comme celui de la lignine, l'extraction n'est possible qu'après dégradation oxydative (par exemple sous l'effet du peroxyde d'hydrogène) qui va entraîner une dépolymérisation et une solubilisation progressive (Macheix *et al.*, 2005).

6. 2. Dosage global

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal. Néanmoins une estimation rapide de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes, en particulier par utilisation d'un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate commercialisé sous la dénomination de réactif de Folin Ciocalteu (Harborne, 1989). Cette méthode est très sensible, et on peut avoir une bonne approximation de la teneur de l'extrait en phénols que l'on exprime alors par rapport à un composé de référence (par exemple l'acide gallique) (Macheix *et al.*, 2005).

6. 3. Caractérisation et dosage des composés phénoliques par spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode quantitative et qualitative, sensible, et permet d'analyser les échantillons à faible concentration. Les spectres sont caractéristiques aux molécules, et procurent des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions (Madi, 2010).

6. 4. Séparations chromatographiques sur papier, couche minces et colonnes

Avant l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance, les séparations chromatographiques sur papier, sur couche mince ou sur colonne avaient été également développées pour la séparation des composés phénoliques (Van Sumer, 1989).

6. 4. 1. Séparation chromatographique sur papier

Cette technique se repose sur le principe de partage des produits. Elle est constituée d'une phase stationnaire « le papier » et d'une phase mobile « le solvant » qui entraîne les molécules séparées avec des vitesses et des distances différentes, selon leur degré d'affinité vis-à-vis les deux phases. Elle est généralement appliquée pour la séparation et la purification des produits ayant de petites quantités (Madi, 2010).

6. 4. 2. Séparation chromatographique sur couche mince

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile (Ekoumou, 2003; Debete, 2005) qui est en générale un mélange de solvants; adapté au type de séparation recherché et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique de l'extrait (Ferrari, 2002).

6. 4. 3. Séparation chromatographique sur colonne

Cette technique repose sur le phénomène d'adsorption, dont les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant; les produits apolaires sont élués les premiers (Madi, 2010).

6. 5. Séparations par chromatographie liquide à haute performance et par électrophorèse capillaire

6. 5. 1. Séparation par chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est, de très loin, la technique la plus performante et la plus utilisée pour la séparation et le dosage des composés phénoliques (Wulf et Nagel, 1978; Moller et Herrmann, 1982). Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération rapide et reproductible les analyses qualitative et quantitative d'un extrait phénolique complexe, ce qui a permis l'étude de matériaux végétaux très variés (Macheix *et al.*, 1990; Pietta *et al.*, 2003).

6. 5. 2. Séparation par électrophorèse capillaire

A côté de la CLHP, une autre technique de séparation performante des composés phénoliques est l'électrophorèse capillaire (EC) développée pour ce type de molécules et dont la sensibilité est environ 10 fois supérieure à celle de la CLHP. Elle conduit à des séparations différentes de celles obtenues par CLHP et trouve de bonnes applications dans la séparation des nombreux glycosides des flavonoïdes (Markham et Bloor, 1998). En plus de la qualité des séparations obtenues, un des intérêts majeurs de la séparation des polyphénols par CLHP ou EC concerne l'automatisation possible des analyses qui peuvent être couplées en d'une part avec la détection et le dosage de chacun des composés en UV et d'autre part avec la spectrométrie de masse qui donne des informations sur leur structure chimique (Swinny et Markham, 2003).

6. 6. Détermination de la structure des composés phénoliques par les méthodes physico-chimiques

Différents types d'hydrolyse ont permis d'apporter depuis fort longtemps des indications précieuses sur les liaisons chimiques associant les différentes molécules formant un composé phénolique natif, en particulier entre l'aglycone et la partie glucidique (Markham et Bloor, 1998). Ces approches sont cependant très insuffisantes pour élucider la structure fine de ces composés et on fait appel pour cela aux techniques physico-chimiques utilisées classiquement par les chimistes (spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire, spectrométrie Raman...) (Macheix *et al.*, 2005).

La spectrométrie de masse permet d'apporter la preuve de l'identité des composés phénoliques préalablement séparés par CLHP ou EC en apportant, grâce à la fragmentation de la

molécule, des informations sur sa masse moléculaire et sur les principaux groupements chimiques présents (Kuhnle, 2003).

La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil puissant pour la détermination de nouvelles structures phénoliques inconnues et de très nombreux exemples appartenant à des classes variées et particulièrement celle des flavonoïdes ont été décrits (Swinney et Markham, 2003).

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

1. 1. Présentation des variétés d'haricot sec

Cette étude a porté sur deux variétés d'haricot sec. La première variété "*MGT djedida*" est une variété locale caractérisée par une couleur rouge foncée, de taille moyenne et de texture onctueuse. La deuxième variété "*Tima*" est une variété importée, caractérisée par une couleur blanche, de taille petite et réniforme (Annexe 01).

La variété locale "*MGT djedida*" nous a été fournie par le C.C.L.S d'El Khroub, wilaya de Constantine, elle a été récoltée en juillet 2010 et elle a été stockée dans des sachets en papier à température environnementale. La variété "*Tima*" a été importée de la France et a été achetée d'un point de vente des légumes secs destinés à la consommation humaine, wilaya de Jijel. Elle a été stockée dans des sachets en plastique perforé de 25kg à température environnementale. Le choix de ces deux variétés est fondé sur la différence de couleur des grains, l'origine et la génétique.

1. 2. Triage des grains

Pour chaque variété d'haricot sec, une séparation préalable en deux lots a été réalisée. Un lot des grains supposés sains (GS) et un autre pour des grains supposés contaminés (GC). Cette séparation s'est effectuée en se basant sur un certain nombre de critères morphologiques tels que :

- ❖ le changement de la couleur du tégument (enveloppe externe);
- ❖ le changement de l'aspect du grain (grain ridé);
- ❖ le changement de la forme du grain;
- ❖ la présence de cicatrices ou de blessures sur le grain, etc. (Botton *et al.*, 1990).

2. Méthodes

Toutes les analyses ont été effectuées aux laboratoires de l'institut de la nutrition, de l'alimentation, et des technologies agro alimentaires (I.N.A.T.A.A).

La détermination du taux d'humidité des grains d'haricots secs, l'extraction et le dosage des polyphénols totaux ont été réalisés au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie.

L'activité antifongique a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie. Pour éviter les résultats biaisés, tous les essais ont été répétés trois fois.

2. 1. Mesure du taux d'humidité des grains d'haricots secs

Le taux d'humidité de la farine issue des grains entiers d'haricots secs est déterminé par séchage à l'étuve à une température de 110°C d'une prise d'essai de 05g jusqu'à un poids constant et il est exprimé en pourcentage (François, 2004):

$$H (\%) = (M1 - M2) / M1 \times 100$$

Avec :

H (%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M1 : Poids de l'échantillon en gramme avant séchage.

M2 : Poids de l'échantillon en gramme après le séchage.

2. 2. Recherche et identification des moisissures

2. 2. 1. Isolement

Pour l'isolement des moisissures, nous avons utilisé la méthode d'ulster ou la méthode directe. C'est la méthode préférée par plusieurs auteurs notamment Nguyen (2007) pour détecter et isoler les mycètes des grains. Avec cette méthode, le développement des moisissures est stimulé par incubation des grains directement déposés sur un milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe 02) (Botton *et al.*, 1990).

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 contaminés", à la désinfection de la surface d'un échantillon de chaque lot par l'éthanol 95% (Guiraud, 2003).

Dans des boîtes de pétri renfermant le milieu PDA, 08 grains de chaque lot (GS et GC désinfectés et non désinfectés superficiellement des deux variétés) sont déposés par boîte de telle manière qu'ils soient suffisamment espacés. Ces boîtes sont fermées hermétiquement avec du parafilm et incubées à 30°C pendant trois à quatre jours afin de favoriser la croissance des moisissures contaminants des grains (Dehimat, 1990).

2. 2. 2. Purification

La purification des moisissures est effectuée par prélèvement d'un hyphes terminal après une culture en boîte de pétri sur un milieu neuf (PDA). La souche estensemencée au centre de la boîte. Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant (Guiraud, 2003).

2. 2. 3. Identification

Il est relativement facile d'identifier le genre, mais il est beaucoup plus délicat de déterminer avec certitude l'espèce (Guiraud, 2003). L'identification des genres a reposé sur des caractères cultureux (macroscopiques) et morphologiques (microscopiques) (Botton *et al.*, 1990).

2. 2. 3. 1. Etude des caractères cultureux

Les caractères cultureux ont été étudiés essentiellement sur le milieu PDA coulé en boîte de pétri et ensemencé par touche. L'examen macroscopique consiste en une observation avec binoculaire ou à l'œil nu des caractères cultureux des colonies (Smith, 2002).

Les caractères cultureux ainsi étudiés sont :

- ❖ la vitesse de croissance ;
- ❖ la couleur des colonies ;
- ❖ la texture du thalle ;
- ❖ la présence ou l'absence des exsudations ;
- ❖ la couleur et le changement de la couleur du milieu.

2. 2. 3. 2. Etude des caractères microscopiques

L'observation *in situ* de la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium s'est faite en employant la technique du montage sans coloration. Les préparations microscopiques se font à l'état frais en milieu liquide entre lame et lamelle. La manipulation consiste à mettre un petit fragment mycélien sur une lame propre placée entre deux becs bunsen en présence d'une goutte du liquide de montage (Lactophénol d'AMANN) (Annexe 02) et légèrement le dilacérer avec deux aiguilles pour éviter la réalisation d'une préparation trop dense et inobservable (Botton *et al.*, 1990), puis le recouvrir délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements.

2. 2. 4. Conservation des souches

Les souches isolées sont conservées en tubes sur gélose inclinée (PDA). Après repiquage, les cultures sont maintenues pendant une semaine à 30°C puis stockées à 4°C pour favoriser la viabilité et limiter les possibilités de variation (Bouchet *et al.*, 1999).

2. 3. Evaluation de la teneur en polyphénols totaux des grains

2. 3. 1. Echantillonnage

Les grains entiers des deux variétés d'haricot sec sont broyés à l'aide d'un broyeur automatique afin d'obtenir de la farine et d'extraire mieux les polyphénols.

2. 3. 2. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux des variétés d'haricot sec (variété blanche : échantillon sain et échantillon contaminé, variété rouge: échantillon sain et échantillon contaminé) est réalisée selon le protocole proposé par Luthria et Pastor-Corrales (2006) et modifié par Mujica *et al.* (2009).

1g de la farine de chaque échantillon est solubilisé dans 25ml du mélange méthanol 80% (méthanol-eau distillée 80:20; v/v) acidifié avec 0.1% HCl 2N. Le mélange est laissé 2h à température ambiante, puis il est centrifugé à 1800g pendant 15min. Le résidu est ré-extrait avec 25ml du méthanol 80% et centrifugé une autre fois. A la fin, les surnageants sont combinés et l'extrait sec est récupéré après une évaporation à sec (Figure 04).

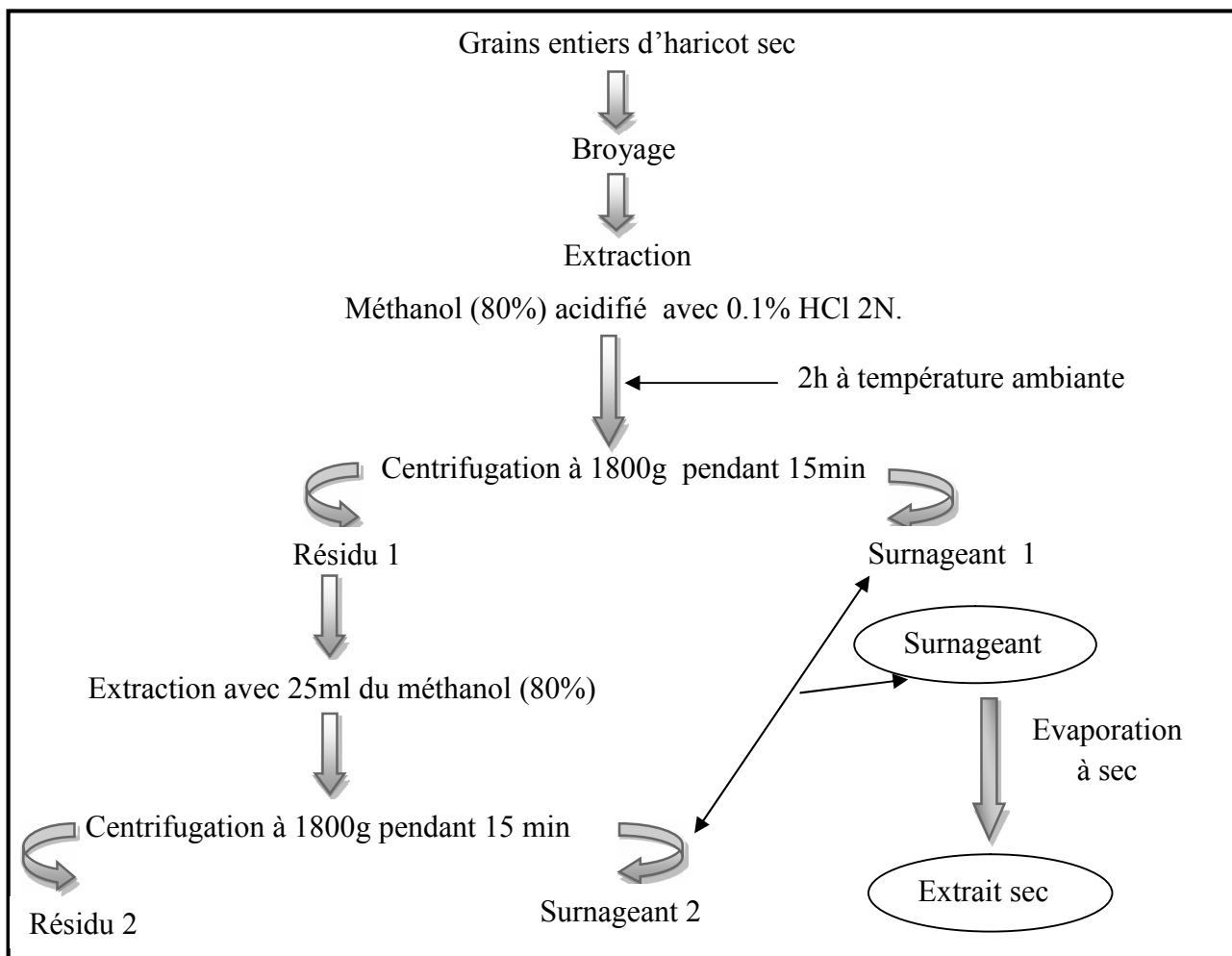


Figure 04. Récapitulation des étapes d'extraction des polyphénols totaux.

2. 3. 3. Dosage des polyphénols totaux

La quantification des polyphénols totaux est basée sur la réaction de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est choisie pour les raisons suivantes :

- ❖ c'est une méthode bien standardisée, elle répond aux critères de faisabilité et de reproductibilité;
- ❖ la disponibilité du réactif de Folin;
- ❖ la grande longueur d'onde (760nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré (Huang *et al.*, 2005).

2. 3. 3. 1. Principe

L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (Ribéreau-Gayon, 1968).

L'absorption est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (Charpentier et Boizot, 2006).

2. 3. 3. 2. Protocole

D'après Singleton *et al.* (1999), le protocole de dosage des polyphénols totaux consiste à ajouter dans 100 µl d'extraits polyphénoliques obtenus par dissolution de 0,02 g d'extraits secs dans 1ml du méthanol, 250 µl de réactif de Folin dilué avec l'eau distillée (50 % v/v). Après 5 min d'incubation à 25 °C, 250 µl de carbonate de sodium ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) à 20 % (p/v) sont ajoutées dans les tubes et le tout est amené à 2000 µl avec de l'eau distillée. L'absorbance est lue à 760 nm après 60 min. Le blanc est préparé pour chaque échantillon, en remplaçant nos extraits polyphénoliques par le méthanol 80% (Figure 05).

La concentration des polyphénols totaux, est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0,03-0,50 mg/ml) en se basant sur des essais préalables, et est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) :

$$T = c \cdot v / m$$

Avec :

T : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique/g d'extrait du grain).

c : concentration en équivalent acide gallique (mg/ml).

v : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait du grain (g) (Madi, 2010).

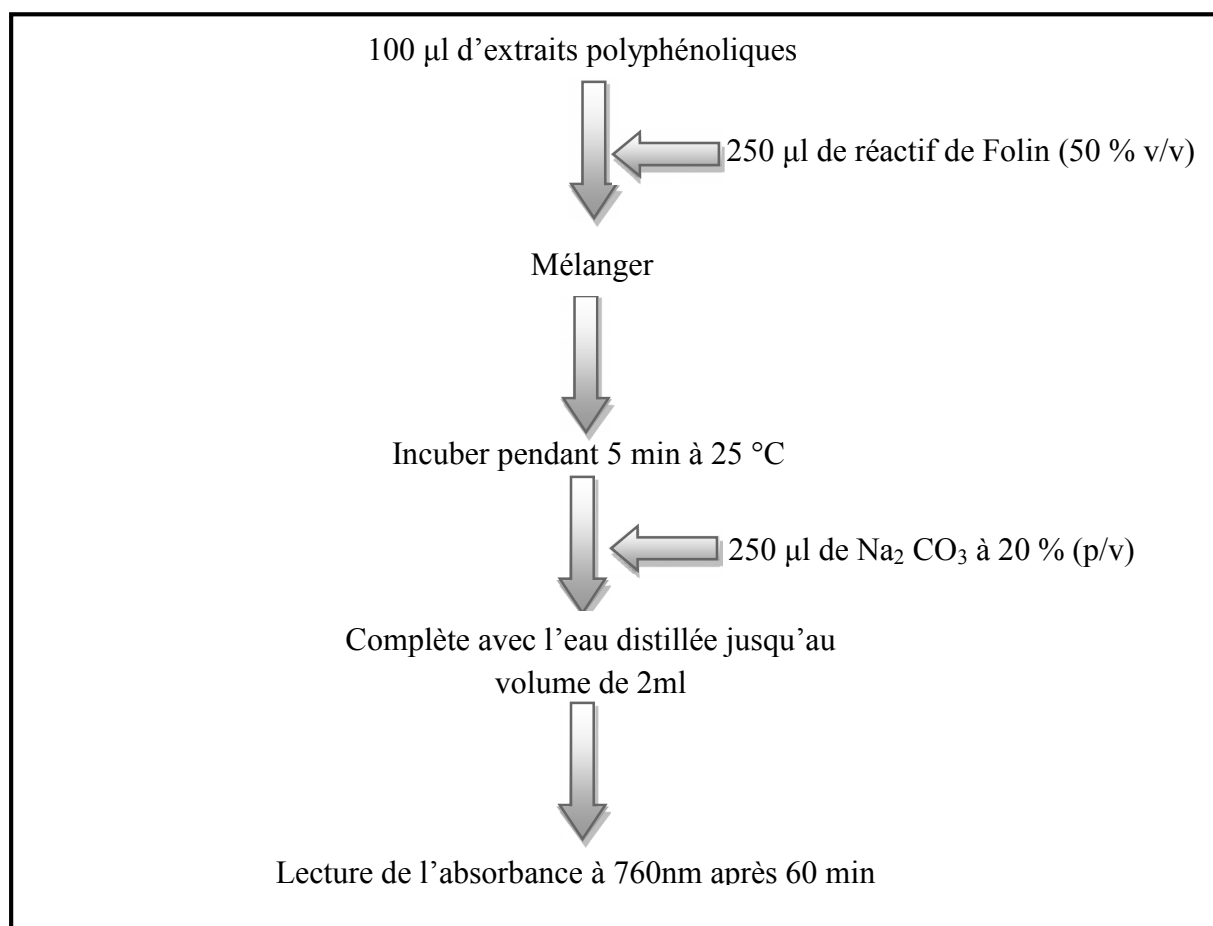


Figure 05. Récapitulation des étapes de dosage des polyphénols totaux.

2. 4. Test du pouvoir antifongique des extraits polyphénoliques

2. 4. 1. Choix du solvant de récupération des extraits polyphénoliques

Si les extraits polyphénoliques doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant de récupération peut être critiquable car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique (Yrjönen, 2004). Pour cela, nous avons choisi le diméthyle sulfoxyde « DMSO » qui est le solvant préférable par la majorité des auteurs, notamment, Alavi *et al.* (2005), Mohammadi (2006) et Ownagh *et al.* (2010) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antifongique puissant.

2. 4. 2. Essai antifongique

L'activité antifongique des extraits polyphénoliques a été réalisée sur six souches. Une souche, choisie au hasard de chaque genre, a été testée *in vitro* par la méthode du contact direct, sur milieu gélosé « PDA » pour déterminer les taux d'inhibition, en comparant leur action à diverses concentrations sur la croissance mycélienne (Hussin *et al.*, 2009) et pour estimer l'IA₁₀₀

(l'index antifongique 100), et sur milieu liquide, Potato Dextrose Broth « PDB » pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration fongicide (CF) et la concentration fongistatique (CFS) (Derwich *et al.*, 2010).

2. 4. 2. 1. Méthode du contact direct

a) Détermination du taux d'inhibition

***Préparation des dilutions des extraits polyphénoliques des grains d'haricots secs**

En se basant sur des essais préalables, une gamme de solutions de concentrations allant de 18,75mg/ml à 300 mg/ml a été préparée comme suit:

- 3g de chaque extrait sec polyphénolique sont introduits dans un tube contenant 10 ml du DMSO (300mg/ml);
- 5ml de l'extrait solubilisé sont ensuite introduits dans un autre tube contenant 05 ml du DMSO (150 mg/ml) ;
- Procéder de la même manière pour obtenir 75 - 37,5 et 18,75 mg/ml (Figure 06).

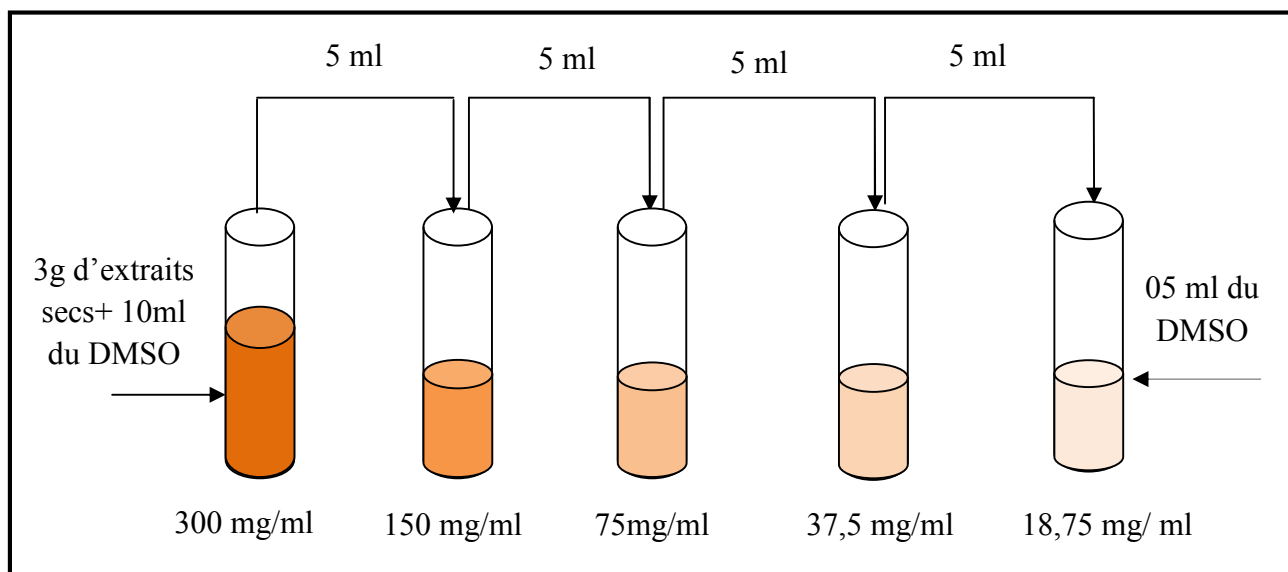


Figure 06. Préparation des dilutions des extraits polyphénoliques.

***Ensemencement**

Un ml de chaque extrait polyphénolique, pour chaque concentration, est ajouté dans des tubes contenant 19 ml du milieu PDA stérile encore liquide. Le mélange est homogénéisé et ramené à 45°C (Subrahmanyam *et al.*, 2001). Ensuite, il est immédiatement coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm (20ml/boîte) (Satish *et al.*, 2010). Après solidification de gélose, les

boîtes de pétri sont partagées en six parties (correspond au nombre de souches à tester) et ensemencées par un disque mycélien, de 6 mm de diamètre pris de la culture jeune du mycète. Le PDA sans extrait a servi de témoin pour chaque souche (Mishra et Dubey, 1994; Khallil, 2001).

Les concentrations finales en extraits polyphénoliques utilisées ont été calculées à partir de l'équation suivante :

$$C_f = C_i/20$$

Avec :

C_f : concentration finale de l'extrait polyphénolique dans 1ml du PDA;

C_i : concentration initiale de l'extrait polyphénolique solubilisé dans le DMSO (Mohammedi, 2006).

*Incubation

Les souches sont incubées pendant 2 jours pour *Rhizopus sp.*, 4 jours pour *Alternaria sp.* et *Moniliella sp.*, 7 jours pour *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Fusarium sp.*, à la température de 30°C (Mohammedi, 2006).

*Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, par comparaison au témoin, a été calculé par la formule suivante :

$$PI (\%) = (A - B) / A \times 100$$

Où :

PI(%) : Taux d'inhibition exprimé en pourcentage;

A : Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »;

B : Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait du grain (Bajpai *et al.*, 2010).

L'extrait polyphénolique est dit:

- ❖ Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100%; la souche fongique est dite très sensible;
- ❖ Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 74%; la souche fongique est dite sensible;

- ❖ Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 49%; la souche est dite limitée;
- ❖ Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 24%; la souche est dite peu sensible ou résistante (Alcamo, 1984).

b) Détermination de l'index antifongique (IA₁₀₀)

La concentration qui inhibe 100% la croissance mycélienne est exprimée par l'IA₁₀₀. Les valeurs de l'IA₁₀₀ ont été calculées graphiquement, où, l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait polyphénolique et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition de la croissance des moisissures (Chang *et al.*, 2008).

2. 4. 2. 2. Méthode de dilution en milieu liquide

Cette technique comporte deux étapes, la première permettant de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) et la seconde permettant de déterminer les concentrations fongicide (CF) et fongistatique (CFS).

a) Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMIs)

Préalablement, le milieu PDB a été préparé et stérilisé puis conservé dans des flacons de 250 ml.

***Préparation des suspensions des souches fongiques**

Après sporulation des souches fongiques choisies (ensemencées sur 20 ml de PDA dans des boîtes de pétri), les spores des cultures jeunes sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile sous agitation vigoureuse (Solis-Pereira *et al.*, 1993). Après, on procède à une évaluation de l'absorbance (lecture à une longueur d'onde de 625 nm) de la suspension fongique; cette évaluation est effectuée dans le but de standardiser la suspension de spores à 10⁶ spores/ml (Hossain *et al.*, 2008). On estime qu'une absorbance comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10⁶ spores/ml (Braga *et al.*, 2007).

***Préparation des dilutions des extraits polyphénoliques**

Les extraits polyphénoliques des grains de la variété blanche saine (PHBS), la variété blanche contaminée (PHBC), la variété rouge saine (PHRS) et la variété rouge contaminée (PHRC), solubilisés dans le DMSO, sont ajoutés au PDB à raison de 1ml dans 9 ml pour avoir une concentration de 30 mg/ml. On procède ensuite à une dilution successive de PDB de façon à

obtenir successivement les dilutions 15 - 7,5 - 3,75 - 1,875 mg/ml. Ces concentrations ont été choisies après des tests préliminaires.

***Ensemencement**

Une suspension de spores de 10 µl de souches fongiques à tester a été inoculée dans les tubes à essai contenant le milieu PDB à différentes concentrations; ces tubes sont incubés pendant 2 à 7 jours à 30°C. En parallèle, un tube contenant le milieu PDB a été inoculé seulement avec la suspension fongique de spore, il va servir de témoin.

***Lecture et expression des résultats**

Les concentrations minimales pour lesquelles aucune croissance évidente n'a été observée, sont définies comme des concentrations minimales inhibitrices (Bajpai *et al.*, 2008).

b) Détermination des concentrations fongicide (CF) et fongistatique (CFS)

Pour les tubes dans lesquels aucune croissance n'est constatée, on poursuit l'expérimentation dans des boîtes de pétri. Chaque boîte contenant 20ml de PDA stérile est inoculée avec 10µl de chaque tube présentant une inhibition totale de la croissance fongique. Le suivi de la croissance est effectué pendant 1 à 4 jours à une température de 30°C. Lorsqu' il n'y a aucune reprise de croissance; les concentrations sont dites fongicides (CFs) (Zarrin *et al.*, 2010) et les concentrations pour lesquelles il y a croissance sont dites fongistatiques (CFSs) (Bajpai *et al.*, 2010).

2. 5. Traitement statistique

Les moyennes plus ou moins les écarts types des essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par l'Excel 2007.

Les résultats obtenus ont été traités par deux analyses indépendantes à l'aide de logiciel XLSTAT (2008). La première analyse est l'analyse de la variance « ANOVA » permettant de connaître la signification des différences (le seuil de signification est $\leq 0,05$). La deuxième analyse consiste à mettre en évidence des corrélations entre les variables étudiés (taux d'humidité, taux de contamination et teneur en polyphénols totaux) au seuil de signification $\leq 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Taux d'humidité des échantillons d'haricot sec

Les taux d'humidité révélés varient entre 11,47% et 12,50%. Ils sont équivalents à $11,47 \pm 0,15\%$, $12,50 \pm 0,05\%$, $11,60 \pm 0,05\%$ et $12,00 \pm 0,30\%$ respectivement pour la variété rouge saine (HRS), la variété rouge contaminée (HRC), la variété blanche saine (HBS) et la variété blanche contaminée (HBC) (Figure 07).

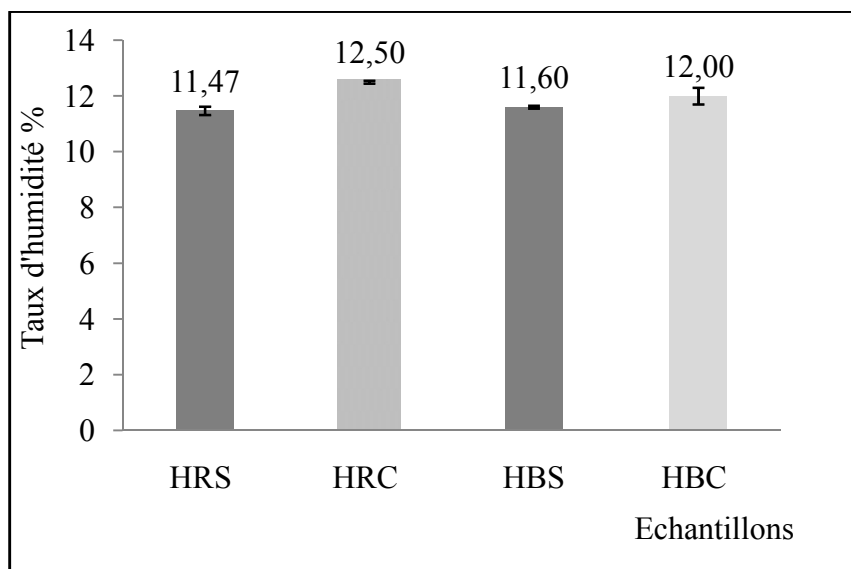


Figure 07. Taux d'humidité des échantillons d'haricot sec.

D'une manière générale et sur le plan variétal, l'analyse de la variance (ANOVA) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux variétés (blanche et rouge). Sur le plan échantillonnage, aucune différence significative ($p \leq 0,05$) n'a été constatée entre le lot sain et le lot contaminé pour la variété blanche, par contre elle est significative pour la variété rouge (Tableau 08).

Tableau 08. Analyse des différences par le test de Tukey entre les échantillons d'haricot sec pour le taux d'humidité ($p \leq 0,05$).

Echantillons	Moyenne estimée		
	Echantillon sain (HS)	Echantillon contaminé (HC)	Moyenne de la variété
Variété rouge	$11,47 \pm 0,15^c$	$12,50 \pm 0,05^a$	$11,98 \pm 0,10$
Variété blanche	$11,60 \pm 0,05^b$	$12,00 \pm 0,30^b$	$11,80 \pm 0,17$

La même lettre signifie absence de différence significative

Les haricots secs, sont des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminées par les moisissures avant la récolte, au champ, au cours du séchage, ou au cours du stockage des grains. Si de très nombreuses études sont disponibles concernant la contamination mycotoxique des

grains, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. D'une manière générale, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et le taux d'humidité des grains pendant le stockage (Tabuc, 2007).

Les moisissures sont d'autant plus redoutables qu'elles supportent de très faibles taux d'humidité. Un taux d'humidité supérieur à la valeur critique déclenche l'altération fongique des grains. D'après Pitt et Mischamble (1995), un taux d'humidité de 10 à 15% favorise le développement des moisissures de stockage dont les plus fréquentes sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Selon Multon (1982), le degré d'humidité exigé au cours du stockage des grains ne doit pas dépasser 11% pour éviter une telle altération.

D'après les résultats obtenus, les échantillons d'haricot sec analysés contiennent suffisamment d'eau pour entraîner le développement des moisissures. Cependant, ces résultats semblent être différents de ceux constatés par Laïb (2009), où les taux d'humidité révélés étaient supérieurs à 15%. Cette différence nous semble toute à fait normale, puisque l'humidité du grain dépend de plusieurs facteurs dont la variété, la géographie, la période de récolte, la température du stockage, etc.

Nous tenons à signaler, pour nos variétés, excepté leurs origines, plusieurs facteurs sont ignorés notamment les conditions de récolte, les conditions et la durée de stockage. A titre d'exemple les attaques, par différents agents pathogènes inclus les moisissures, sont accrues si les grains sont stockés longtemps (Cruz et Diop, 1989).

2. Isolement et dénombrement des moisissures

Sur les deux variétés d'haricot sec, 43 souches ont été révélées par la méthode directe et sont réparties comme suite :

- ❖ Trois souches à partir de l'échantillon superficiellement désinfecté de la variété rouge saine. Ces souches sont codées: HRSD1, HRSD2, HRSD3.
- ❖ Cinq souches à partir de l'échantillon non désinfecté de la variété rouge saine. Ces souches sont codées: HRS1, HRS2, HRS3, HRS4, HRS5.
- ❖ Cinq souches à partir de l'échantillon désinfecté superficiellement de la variété rouge contaminée. Ces souches sont codées: HRCD1, HRCD2, HRCD3, HRCD4, HRCD5.

- ❖ Sept souches à partir de l'échantillon non désinfecté de la variété rouge contaminée. Ces souches sont codées: HRC1, HRC2, HRC3, HRC4, HRC5, HRC6, HRC7.
- ❖ Trois souches à partir de l'échantillon désinfecté superficiellement de la variété blanche saine. Ces souches sont codées: HBSD1, HBSD2, HBSD3.
- ❖ Sept souches à partir de l'échantillon non désinfecté de la variété blanche saine. Ces souches sont codées: HBS1, HBS2, HBS3, HBS4, HBS5, HBS6, HBS7.
- ❖ Trois souches à partir de l'échantillon désinfecté superficiellement de la variété blanche contaminée. Ces souches sont codées: HBCD1, HBCD2, HBCD3.
- ❖ Dix souches à partir de l'échantillon non désinfecté de la variété blanche contaminée. Ces souches sont codées: HBC1, HBC2, HBC3, HBC4, HBC5, HBC6, HBC7, HBC8, HBC9, HBC10.

3. Taux de contamination des échantillons d'haricot sec

3. 1. Taux de contamination de la variété rouge

Les grains de la variété rouge d'haricot sec se sont révélés contaminés par 20 souches parmi les 43 souches isolées, ce qui correspond à un taux de contamination de 46,51% (Tableau 09).

Tableau 09. Taux de contamination de la variété rouge d'haricot sec.

Echantillons	Codes	Taux de contamination (%)	Total (%)
sain désinfecté	HRSD	6,97	18,60
sain non désinfecté	HRS	11,63	
contaminé désinfecté	HRCD	11,63	27,91
contaminé non désinfecté	HRC	16,28	

a) Variété rouge saine

Malgré l'apparence saine des grains de la variété rouge analysée, leur taux de contamination s'est révélé relativement élevé (18,60%). La densité des souches fongiques dans le lot sain non désinfecté (11,63%) est supérieure à celle du lot sain désinfecté (6,97%); Ce qui signifie que 4,66% de la contamination est réellement superficielle et que 6,97% est une contamination profonde.

b) Variété rouge contaminée

Le taux de contamination des grains d'haricot sec rouge supposés contaminés (27,91%) est plus élevé que celui des grains supposés sains (18,60%). La désinfection superficielle a permis de réduire le taux de contamination de 4,65%.

3. 2. Taux de contamination de la variété blanche

Les grains de la variété blanche se sont révélés contaminés par 23 souches parmi les 43 souches isolées, ce qui correspond à un taux de contamination de 53,49% (tableau 10).

Tableau 10. Taux de contamination de la variété blanche d'haricot sec.

Echantillons	Codes	Taux de contamination (%)	Total (%)
sain désinfecté	HBSD	6,98	23,26
sain non désinfecté	HBS	16,28	
contaminé désinfecté	HBCD	6,98	30,23
contaminé non désinfecté	HBC	23,25	

a) Variété blanche saine

Les grains de la variété blanche supposés sains se sont révélés contaminés à 23,26%. La désinfection superficielle de ce lot semble réduire la contamination à 6,98% ce qui signifie que 9,30% sont des moisissures localisées à la surface des grains.

b) Variété blanche contaminée

Les grains de la variété blanche supposés contaminés se sont avérés altérés à 30,23%, dont 6,98% des souches sont localisées en profondeur.

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes peu exigeants, seul un apport de carbone et d'azote est requis pour leur croissance (Abdel Massih, 2007). Les haricots secs, par leur richesse en amidon et en protéine, constituent le milieu approprié qui apporte à la moisissure les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance (Kassemi, 2006). La paroi rigide de la cellule fongique l'empêche de phagocyter les substances nutritives complexes du haricot; la moisissure est obligée de les transformer préalablement en molécules simples absorbables. Ceci est rendu possible grâce à des dépolymérases. Sous leurs actions, les polymères complexes comme l'amidon sont transformés en molécules simples (Tabuc, 2007), ce qui pourrait expliquer la forte densité fongique détectée.

Malgré l'apparence saine des grains, ils sont révélés contaminés. Cette contamination est due à la charge initiale en spores (Tahani *et al.*, 2008) qui après incubation trouvent le milieu favorable pour leur germination et la formation des mycéliums. La faible densité fongique au niveau des grains désinfectés pourrait s'expliquer par l'effet fongicide et fongistatique de l'éthanol (le désinfectant utilisé) (Guiraud, 2003). Ce dernier n'a aucun effet sur les souches dites internes ou profondes des grains.

Le taux de contamination de la variété blanche est plus élevé que celui de la variété rouge. La variété blanche, exposée au marché sans emballage adéquat, est exposée à un environnement chaud et humide ce qui favorise le développement des moisissures (Nguyen, 2007). Même si les deux variétés n'ont pas en commun les mêmes conditions de récolte et de conservation, la variété rouge semble être plus résistante à l'infestation fongique. Du point de vue composition chimique, la variété blanche offre l'avantage de contenir un taux élevé de protéines et de glucides que la variété rouge (Kassem, 2006). Plusieurs auteurs notamment Abdel Massih (2007) a montré une corrélation positive entre l'infestation fongique et la richesse des grains en ses deux éléments. De même, la variété rouge renferme plus de composés phénoliques d'où leur couleur (Beninger et Hosfield, 2003), ces derniers sont connus par leur effet résistant aux attaques pathogènes (Cherif *et al.*, 2007). Les composés polyphénoliques offrent un moyen de lutte très approprié sur le plan économique.

Face aux dommages causés par l'infestation fongique des cultures d'haricots secs, des travaux ont incité soit la recherche de variétés résistantes soit l'introduction des gènes de résistance de deux espèces donneuses *Phaseolus coccineus* L. et *Phaseolus polyanthus* Greenm, phylétiquement les plus proches de *Phaseolus vulgaris*, ce qui favorise la réalisation des croisements interspécifiques, où ces deux espèces sont utilisées comme parents maternels afin de favoriser l'introgression des gènes utiles de ces deux taxons (Baudoin *et al.*, 2004).

4. Identification des genres

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Botton *et al.* (1990), Chabasse *et al.* (2002) ainsi que celles de Guiraud (2003)

4. 1. Etude macroscopique

Les principaux caractères macroscopiques des différentes souches fongiques isolées des variétés rouge et blanche d'haricot sec sont rassemblés dans les tableaux 11, 12, 13 et 14. Ces

tableaux résumant : l'aspect du mycélium, la croissance, la surface et la consistance des colonies, la couleur du revers de la boîte, la présence ou l'absence d'exsudation et de pigments caractéristiques de chaque souche.

4. 2. Etude microscopique

L'étude microscopique a porté sur l'observation des structures caractéristiques de 43 souches fongiques isolées (Tableau 15).

Les souches révélées appartiennent à six genres de moisissure. Ces genres sont : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Moniliella*, *Penicillium* et *Rhizopus*. Quatre de ces genres ont été déjà identifiés et cités par Laïb (2009) chez les haricots secs exposés au marché localisé au niveau de la région de Skikda. Les deux autres genres *Fusarium* et *Moniliella*, sont révélés seulement sur la variété importée. Ceci pourrait être expliqué probablement par les conditions médiocres d'exposition des légumes secs au marché, le plus souvent sans emballage adéquat, cette méthode de vente est pratiquement identiques dans l'Est Algérien.

D'autres études sur la flore fongique des légumineuses ont montré que les mycètes de stockage des haricots (*Phaseolus vulgaris*) en Inde a inclut les genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Stemphylium* et *Trichoderma* (Sud *et al.*, 2005). Les espèces appartenant aux genres *Penicillium* et *Eurotium* étaient communes pour les haricots Taiwanais, mais, dans les haricots Canadiens, les mycètes répandues étaient *Alternaria*, *Fusarium* et *Rhizoctonia* (Tseng *et al.*, 1995).

Tableau 11. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété rouge saine d'haricot sec.

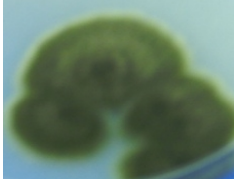
Code des souches révélées	Mycélium aérien	Revers de la colonie	Aspect de la colonie	Surface	Exsudation	Pigmentation	Croissance	Quelques photos du mycélium aérien
HRS1 HRS2	Rose violet	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate et ainsi de suite	Absence	Absence	Lente et non homogène	
HRS3 HRS4 HRS5	Vert olive avec des extrémités blanches	Vert puis noire, strié, avec des extrémités claires	Duveteuse	Plate, en dôme, puis plate	Présence	Absence	Peu rapide	
HRSD1 HRSD2	Vert olive avec des extrémités blanches	Vert puis noire, strié, avec des extrémités claires	Duveteuse	En dôme au centre puis plate	Présence	Absence	Peu rapide	
HRSD3	Rose violet avec des extrémités blanches	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate et ainsi de suite	Présence	Absence	Lente et non homogène	

Tableau 12. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété rouge contaminée d'haricot sec.

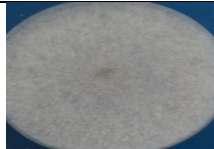
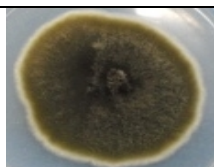
Code des souches révélées	Mycélium aérien	Revers de la colonie	Aspect de la colonie	Surface	Exsudation	Pigmentation	Croissance	Quelques photos du mycélium aérien
HRC1 HRC2	Blanc au début puis devient marron	Crème	Cotonneuse et envahissante	Collante au couvercle de la boîte	Absence	Absence	Rapide	
HRC3 HRC4 HRC5 HRC1 HRC2	Rose violet avec des extrémités blanches	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate et ainsi de suite	Absence	Absence	Lente, non homogène	
HRC6 HRC3	Vert olive avec des extrémités blanches	Vert puis noire, avec extrémités claires	Duveteuse	Plate	Présence	Absence	Peu rapide	
HRC7	Vert olive avec un centre blanc et des extrémités blanches	Vert puis noire, strié avec un centre et des extrémités claires	Duveteuse	En dôme, puis plate	Présence	Absence	Peu rapide	
HRC4	Rose violet avec des extrémités blanches	Crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate et ainsi de suite	Présence	Absence	Lente, non homogène	
HRC5	Vert	Jaune avec des extrémités vertes	Duveteuse	En dôme au centre puis plate	Absence	Absence	Lente, non homogène	

Tableau 13. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété blanche saine d'haricot sec.

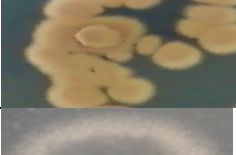
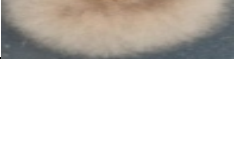
Code des souches révélées	Mycélium aérien	Revers de la colonie	Aspect de la colonie	Surface	Exsudation	Pigmentation	Croissance	Quelques photos du mycélium aérien
HBSD1	Rose avec des extrémités blanches	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme puis plate et ainsi de suite	Absence	Absence	Lente et non homogène	
HBSD2	Rose violet	Crème	Duveteuse	En dôme puis plate et ainsi de suite	Présence	Absence	Lente et non homogène	
HBS1	Blanc au début puis devient marron	Crème	Cotonneuse et envahissante	Collante au couvercle de la boîte de pétrie	Absence	Absence	Rapide	
HBS2	Marron puis devient rose pâle	Rose tend vers le marron	Duveteuse	Plane, lisse	Absence	Absence	Lente	
HBS3 HBS4 HBS5	Rose	Crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate	Absence	Absence	Lente et non homogène	
HBS6	Blanc	Jaune claire	Crémeuses	Plate	Absence	Absence	Peu lente et homogène	
HBS7 HBSD3	Rose blanc dégradé	Orange dégradé	Laineuse	Plate	Présence	Présence	Peu rapide	

Tableau 14. Caractères macroscopiques des souches isolées de la variété blanche contaminée d'haricot sec.

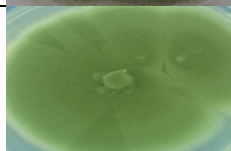
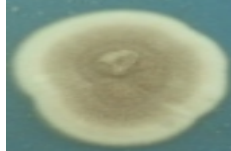
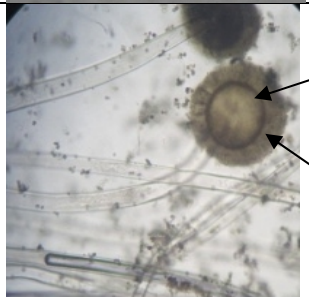
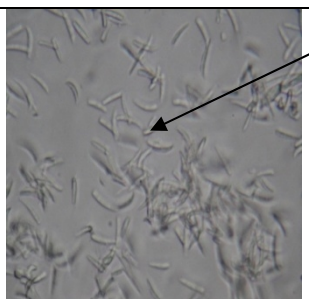
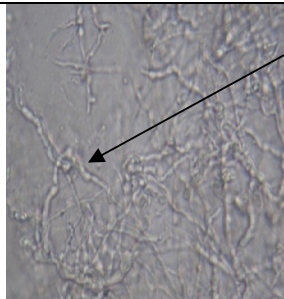
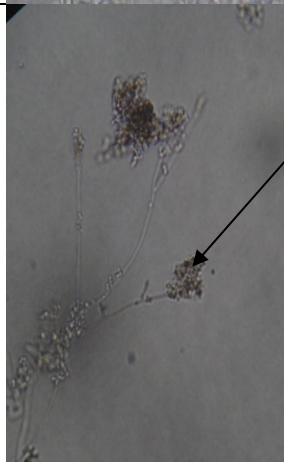
Code des souches révélées	Mycélium aérien	Revers de la colonie	Aspect de la colonie	Surface	Exsudation	Pigmentation	Croissance	Quelques photos du mycélium aérien
HBC1	Rose violet au rose gris	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate et ainsi de suite	Présence	Absence	Lente et non homogène	
HBC2, HBCD1.	Vert bouteille vire au noir	Vert jaune	Poudreuse, granuleuse	Plate	Absence	Absence	Rapide et homogène	
HBC3	Couleur dégradée : vert pistache foncé au centre et claire sur les extrémités	Jaune claire	Poudreuse, granuleuse	Plate	Absence	Absence	Lente	
HBC4	Vert militaire	Crème	Duveteuse	Plate	Absence	Absence	Lente et non homogène	
HBC5 HBC6 HBC7 HBC8 HBC9 HBC10	Rose violet avec des extrémités blanches	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate et ainsi de suite	Absence	Absence	Lente et non homogène	
HBCD2 HBCD3	Rose violet avec des extrémités blanches	Strié de couleur crème	Duveteuse	En dôme au centre puis plate	Présence	Absence	Lente et non homogène	

Tableau 15. Caractères microscopiques des souches isolées des variétés blanche et rouge d'haricot sec.

Code des souches révélées	Etude microscopique	Identification du genre	Quelques exemples d'observation microscopique (x40)
HBS3, HRS4, HRS5, HRC6, HRC7, HRCD3, HRSD1, HRSD2	-Conidiophore septé, noir, à croissance sympodiale; -Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.	<i>Alternaria</i>	 Conidiophore à croissance sympodiale Conidie
HBC2, HBC3, HBDC1	-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules; -Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules; -Têtes conidiennes unisériées ou bisériées; -Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires.	<i>Aspergillus</i>	 Vésicule Phialides et métules
HBS6, HBS7, HBSD3	-Phialides plus au moins allongées produisant des macroconidies courbées, pluriseptées et pointues aux deux extrémités.	<i>Fusarium</i>	 Macroconidie

Résultats et discussion

HBS2	-Mycélium cloisonné, fragment en arthospores ; -Hyphes se prolongeant par une chaîne de conidies ; -Conidies unicellulaires en chapelets ramifiées sur un conidiophore	<i>Moniliella</i>	 Arthospore
HRS1, HRS2, HRSD3, HRC3, HRC4, HRC5, HRCD1, HRCD2, HRCD4, HRCD5, HBSD1, HBSD2, HBS3, HBS4, HBS5, HBC1, HBC4, HBC5, HBC6, HBC7, HBC8, HBC9, HBC10, HBCD2, HBCD3	-Mycélium cloisonné ; -Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; -Pénicille constitué de phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore.	<i>Penicillium</i>	 Pénicille
HRC1, HRC2, HBS1	-Thalle à croissance rapide ; -Sporosystophores généralement très grands, terminés en entonnoir, isolés ou en bouquet de 2-6 présentant à la base de rhizoïdes.	<i>Rhizopus</i>	 Rhizoïdes

5. Taux de contamination des échantillons d'haricot sec en fonction des genres isolés de moisissures

5. 1. Taux de contamination fongique de la variété rouge d'haricot sec

Les grains de la variété rouge d'haricot sec se sont révélés contaminés par trois genres de moisissures, à savoir le genre *Alternaria*, *Penicillium* et *Rhizopus*.

5. 1. 1. Variété rouge saine

Dans la variété rouge saine, *Alternaria* est le genre le plus dominant avec une fréquence de 62,5%, vient ensuite le genre *Penicillium* avec 37,5% (Figure 08).

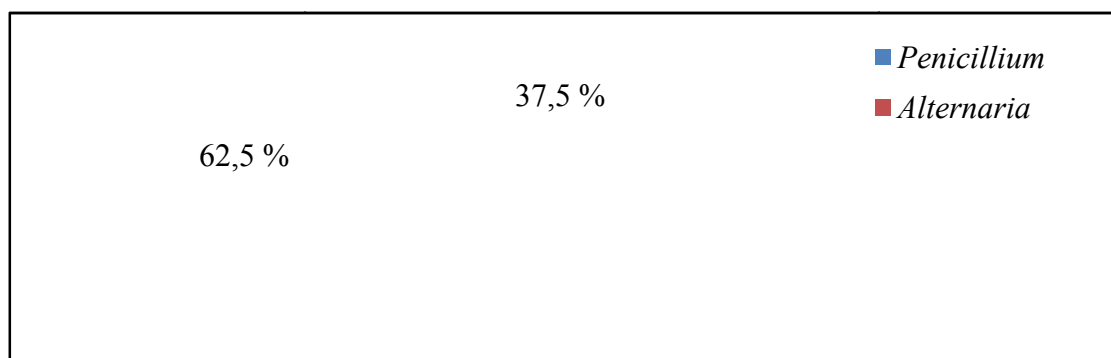


Figure 08. Taux de contamination fongique de la variété rouge saine d'haricot sec.

5. 1. 2. Variété rouge contaminée

Pour la variété rouge contaminée, le genre dominant est le genre *Penicillium* (58,33%), puis le genre *Alternaria* (25%) et en fin *Rhizopus* avec 16,67% (Figure 09).

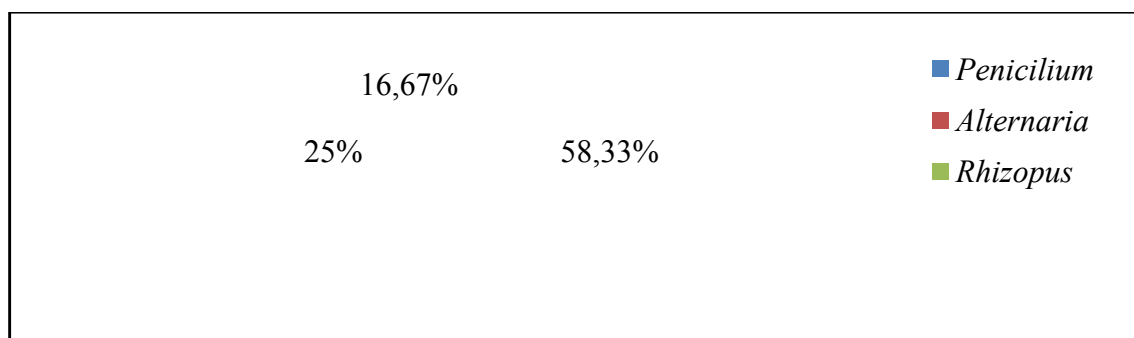


Figure 09. Taux de contamination fongique de la variété rouge contaminée d'haricot sec.

Le genre dominant dans la variété rouge saine d'haricot sec est le genre *Alternaria*. Christensen (1994) signale qu'on peut trouver ce genre dès la récolte; sachant que la variété rouge est analysée juste quelques mois après sa récolte, ce genre peut donc exister dès la récolte.

Quant au genre *Penicillium*, Botton *et al.* (1990) ont souligné qu'au cours du stockage, se développe une flore composée de champignons moins cellulolytiques et plus osmophiles. Les *Penicillium* prolifèrent principalement sur des substrats dont l'humidité est assez basse (10 à 15%) (Pitt et Miscamble, 1995), ce qu'explique la présence de ce genre sur l'échantillon d'haricot sec dont l'humidité est de 11,47%.

En se référant à Botton *et al.*, (1990), le genre *Penicillium*, en prenant de l'extension, élimine peu à peu des champignons peu cellulolytiques et non osmophiles, appartenant surtout aux champignons du champ.

5. 2. Taux de contamination fongique de la variété blanche d'haricot sec

Les grains de la variété blanche d'haricot sec se sont révélés contaminés par les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Moniliella*, *Penicillium* et *Rhizopus*.

5. 2. 1. Variété blanche saine

Dans la variété blanche saine, le genre *Penicillium* est le plus dominant avec une fréquence de 50%, vient ensuite le genre *Fusarium* (30%), *Rhizopus* et *Moniliella* avec des fréquences semblables équivalentes à 10% (Figure 10).

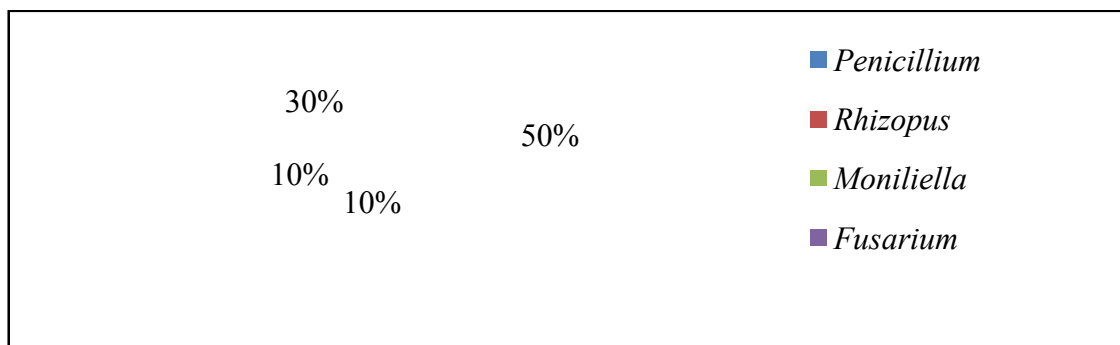


Figure 10. Taux de contamination fongique de la variété blanche saine d'haricot sec.

Les genres *Penicillium*, *Fusarium* et *Rhizopus* sont responsables de la contamination constatée avec respectivement 50%, 30% et 10%. Quant au genre *Moniliella*, malgré la rareté de son isolement (Botton *et al.*, 1990), il a représenté 10% de la contamination de l'échantillon analysé.

En se référant à Abdel massih (2007), malgré que seul des valeurs d'humidité de 22 à 25% provoquent le développement des *Fusarium*, un taux non négligeable de contamination équivalent à 30% a été constaté dans l'échantillon analysé et ayant une humidité seulement de 11,60%.

5. 2. 2. Variété blanche contaminée

Pour la variété blanche contaminée, le genre le plus dominant est le genre *Penicillium* (76,92%), vient ensuite le genre *Aspergillus* avec une fréquence de 23,08% (Figure 11).

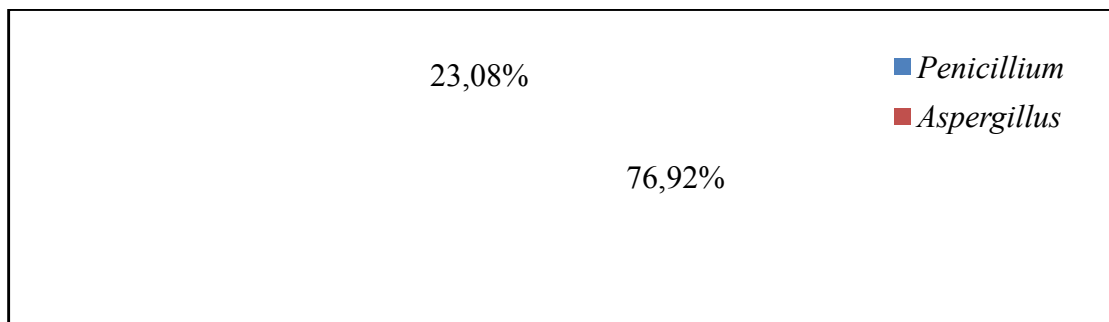


Figure 11. Taux de contamination fongique de la variété blanche contaminée d'haricot sec.

D'après Bourgeois et Larpent (1996), les *Aspergillus* et les *Penicillium* sont les hôtes habituels des grains qui se développent généralement au cours du stockage défectueux. L'haricot sec blanc vendu sans emballage adéquat est exposé aux risques d'insectes et de ravageurs, vecteurs de spores ainsi qu'à des températures et d'humidités fluctuantes, facteurs favorisant la multiplication des moisissures.

Les travaux de Tahani *et al.*, (2008) indiquent que les grains, séparés à cause d'un doute de contamination et la présence des grains brisés, montrent une évolution rapide de leur contamination par les moisissures xérotolérantes (*Aspergillus* et *Penicillium*). Selon Riba *et al.*, (2005), la croissance des *Aspergillus* et *Penicillium* est bien favorisée par le manque de ventilation couplé à une température élevée. La présence des *Aspergillus* et *Penicillium* dans les grains d'haricot sec blanc supposés contaminés analysés peut être due à un manque de ventilation suite à un entassement des grains dans des sachets stockés.

Les cinq genres identifiés sur les échantillons analysés, ont des souches toxigènes. La palette des effets néfastes de leurs mycotoxines est très étendue, des effets cancérologènes, mutagènes, nécrosants, neurotoxiques, hépatotoxiques, hématotoxiques, etc. (Brochard et Le Bâcle, 2009).

6. Evaluation de la teneur des polyphénols totaux

La courbe d'étalonnage obtenue, en prenant l'acide gallique à différentes concentrations comme standard, représentée dans la figure 12, **montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. Le choix de ce modèle de représentation est fondé sur la méthodologie de plusieurs auteurs, notamment Mujica *et al.* (2009).**

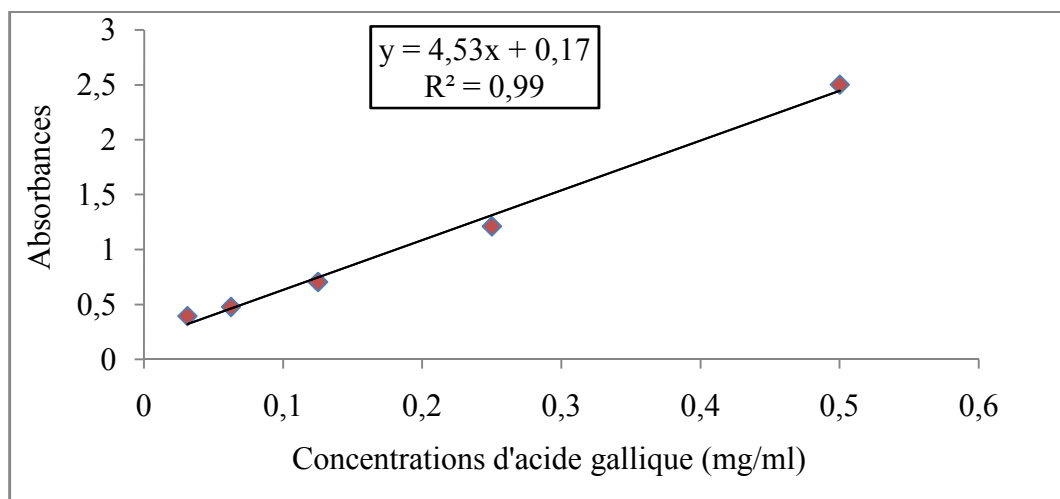


Figure 12. Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

En se basant sur les valeurs d'absorbance des extraits polyphénoliques (Annexe 03), réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu, et comparées à la solution standard d'acide gallique, les résultats de l'analyse quantitative des composés phénoliques totaux sont donnés dans le tableau 16.

Tableau 16. Teneur en polyphénols totaux des extraits (mg EAG/g).

Echantillons	Quantité des phénols totaux (mg EAG/g)	Moyenne (mg EAG/g)
Haricot rouge sain (HRS)	0,42±0,007	0,40±0,005
Haricot rouge contaminé (HRC)	0,39±0,003	
Haricot blanc sain (HBS)	0,32±0,008	0,27±0,005
Haricot blanc contaminé (HBC)	0,22±0,002	

Les résultats enregistrés ci-dessus montrent qu'il y'a un effet variétal, la variété rouge est plus riche en polyphénols totaux (0,40±0,005 mg EAG/g) par rapport à la variété blanche (0,27±0,005 mg EAG/g).

Pour la variété rouge, l'analyse de la variance (ANOVA) ne montre aucune différence intra-variétale significative ($p \leq 0,05\%$) sur le plan quantité de polyphénols entre le lot sain et le

lot contaminé. A l'inverse, la variété blanche présente une différence intra-variétale significative entre les deux lots ($p \leq 0,05\%$) (Tableau 17).

Tableau 17. Analyse des différences par le test de Tukey entre les échantillons d'haricot sec pour la teneur en polyphénols totaux ($p \leq 0,05$).

Echantillons	Moyenne estimée	
	Echantillon sain (HS)	Echantillon contaminé (HC)
Variété rouge	0,42±0,007 ^a	0,39±0,003 ^a
Variété blanche	0,32±0,008 ^b	0,22±0,002 ^c

La même lettre signifie absence de différence significative

Quant à la différence variétale, la même constatation a été faite par Laparra *et al.* (2008); Ying Tan *et al.* (2008); Xu et Chang (2009), où les haricots secs colorés se sont avérés plus riches en polyphénols que les haricots secs blancs. La couleur du grain des haricots est déterminée par la présence et la concentration des glycosides de flavonol, des anthocyanines et des tanins condensés (Reynoso *et al.*, 2006). Le génotype rouge d'haricot sec a un contenu plus élevé en anthocyanines que le génotype blanc. Cette différence est due probablement aux anthocyanines, groupe de colorants hydrosolubles bien connus, qui contribue de manière significative à la coloration des grains (Horbowicz *et al.*, 2008).

Quelque soit la variété, nous remarquons clairement que les échantillons sains sont plus riches en polyphénols totaux que les échantillons contaminés. Il semble que plus les polyphénols sont présents en quantité importante plus la contamination est moindre. Ceci indique l'existence d'une corrélation négative entre le taux de contamination et la teneur en polyphénols totaux dans les grains d'haricots secs. Cette corrélation a été rapportée par plusieurs chercheurs dans le domaine des substances bioactives des végétaux, dont Abad *et al.* (2007) qui attribuent cette propriété aux flavonoïdes, comme les glycosides de flavonol, classe majoritaire des composés polyphénoliques des grains d'haricot sec.

En se référant à la bibliographie et dans l'objectif de comparer les taux en polyphénols totaux obtenus à ceux cités dans la littérature, plusieurs facteurs doivent être pris en considération et qui peuvent influencer le contenu polyphénolique. Il existe des facteurs climatiques et environnementaux (Ebrahimi *et al.*, 2008), des facteurs génétiques, des facteurs expérimentales (Miliauskas *et al.*, 2004), la différence entre les méthodes d'extraction, d'évaluation et d'expression des résultats entre les auteurs (Lee *et al.*, 2003). Par conséquent, il nous a été difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature. Par exemple, Cardador *et al.*

(2002) ont trouvé une teneur de 2,09 mg équivalent de catéchine/g. Dans une autre publication, les mêmes auteurs ont rapporté les concentrations des composés phénoliques de 3,28 à 16,61 mg équivalent de catéchine/ g dans six cultivars d'haricot sec (Oomah *et al.*, 2005). Récemment, Mujica *et al.* (2009) ont trouvé une teneur de 42,8 à 50,1mg GAE/g, cette teneur est très élevée par rapport à nos résultats.

7. Corrélations entre le taux de contamination, l'humidité et la teneur en polyphénols totaux

Les principaux résultats obtenus de la recherche d'éventuelles corrélations (Tableau 18), indiquent une corrélation positivement significative ($r = 0,773$) entre le taux d'humidité et le taux de contamination des grains, ce qui signifie que plus le taux d'humidité est élevé plus le pourcentage de contamination est accru. Cette corrélation peut s'expliquer par le fait que la majorité des moisissures préfèrent des taux d'humidité élevés (Moreau, 1996); en particulier en phase de germination qui nécessite un apport d'eau plus important par rapport à la phase de croissance (Basset, 2009). Par contre, le taux de contamination est corrélé négativement et d'une manière significative ($r = -0,698$) avec la teneur en polyphénols. Cette corrélation inverse peut s'interpréter de deux manières soit le pourcentage de contamination élevé entraîne une réduction de la teneur en polyphénols totaux, soit c'est la présence d'une quantité importante de polyphénols totaux qui provoque une diminution du taux de contamination des grains. En se référant à la bibliographie, cette corrélation est due probablement aux effets fongicides et fongistatiques des polyphénols (Esekhiagbe *et al.*, 2009, Kawamura *et al.*, 2010).

Tableau 18. Matrice de corrélation (*Pearson (n)*) entre les principales analyses effectuées sur les échantillons d'haricot sec (avec un seuil de signification de 0,05).

Variables	Taux d'humidité	Taux de contamination	Teneur en polyphénols
Taux d'humidité	1	0,773*	-0,085
Taux de contamination		1	-0,698*
Teneur en polyphénols			1

* : corrélation significative

8. Test du pouvoir antifongique

8. 1. Taux d'inhibition

Les taux d'inhibition (mesurés en pourcentage) sont représentés dans les figures 13, 14, 15 et 16 d'après le modèle de Golam *et al.*(2011). Cette mesure nous a permis de classer les souches fongiques selon leur degré de sensibilité à chaque concentration testée.

A travers les différents pourcentages d'inhibition obtenus, les polyphénols étudiés ont montré des activités variables sur les souches filamenteuses testées. Les souches appartenant aux genres *Moniliella* et *Alternaria* semblent être les plus sensibles.

Concernant la souche appartenant au genre *Alternaria*, les polyphénols extraits d'haricot rouge contaminé (PHRC) et d'haricot blanc contaminé (PHBC) ont donné des taux d'inhibition supérieurs à ceux des polyphénols d'haricot rouge sain (PHRS) et d'haricot blanc sain (PHBS). Ces derniers sont supérieurs à 50%, pour des concentrations allant de 0,94 mg/ml à 15 mg/ml. Ceci s'explique probablement l'absence de contamination par ce genre dans le cas d'haricot blanc contaminé et la réduction du taux de contamination pour l'haricot rouge contaminé si on compare le taux de contamination avec celui d'haricot rouge sain (Figure 13).

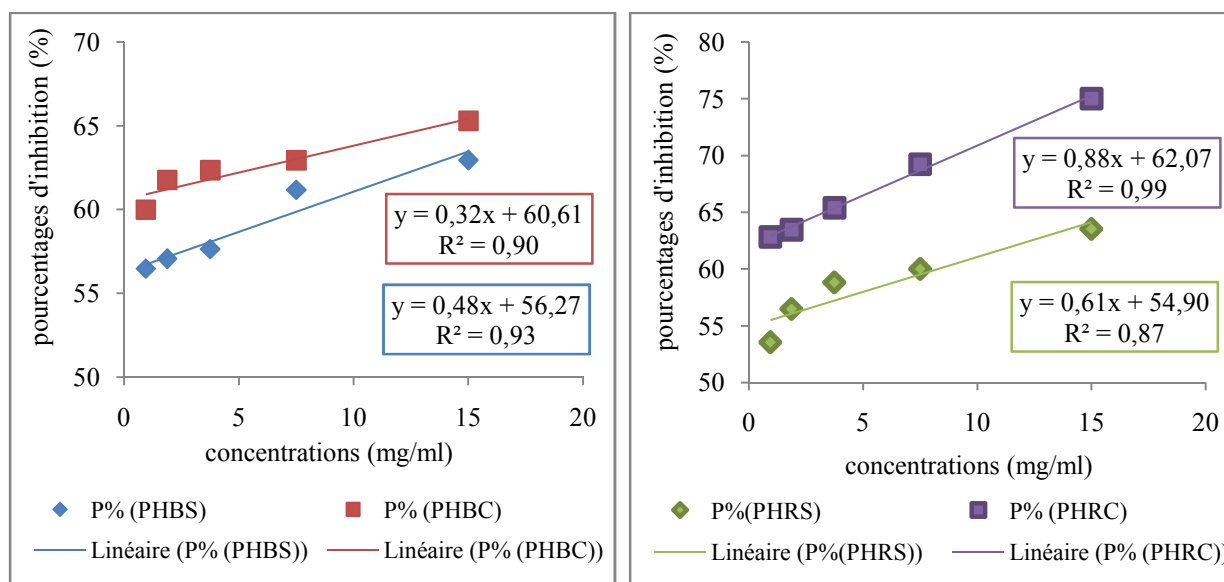


Figure 13. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Alternaria sp.*.

Quant à la souche appartenant au genre *Fusarium*, elle s'est révélée peu sensible aux extraits polyphénoliques d'haricot blanc contaminé pour les cinq concentrations (Figure 14). Les autres types d'extraits polyphénoliques sont moyennement actifs et exercent une dépigmentation du mycélium aérien de la souche considérée (Annexe 05).

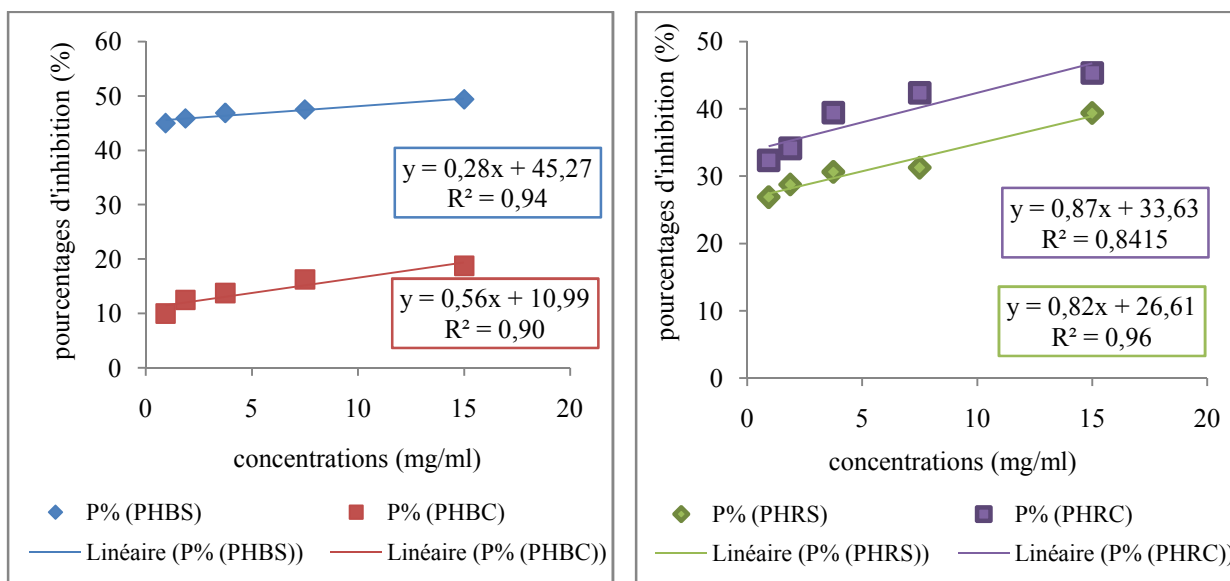


Figure 14. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Fusarium sp.*

Pour *Moniliella sp.*, trois types d'extraits polyphénoliques sont révélés très actifs; les extraits polyphénoliques d'haricot rouge sain, les extraits polyphénoliques d'haricot rouge contaminé et les extraits polyphénoliques d'haricot blanc contaminé pour des concentrations allant de 1,87mg/ml à 15mg/ml (taux d'inhibition >75%) à l'exception du PHRC qui est actif pour les concentrations de 0,94 mg/ml et 1,87 mg/ml. Les extraits polyphénoliques d'haricot blanc sain (PHBS) sont révélés actifs (taux d'inhibition >60%) pour les cinq concentrations. Ceci justifie l'absence de ce genre dans nos échantillons à l'exception du faible voire négligeable taux de contamination pour les grains d'haricot blanc sain (genre rarement isolé) (Figure 15).

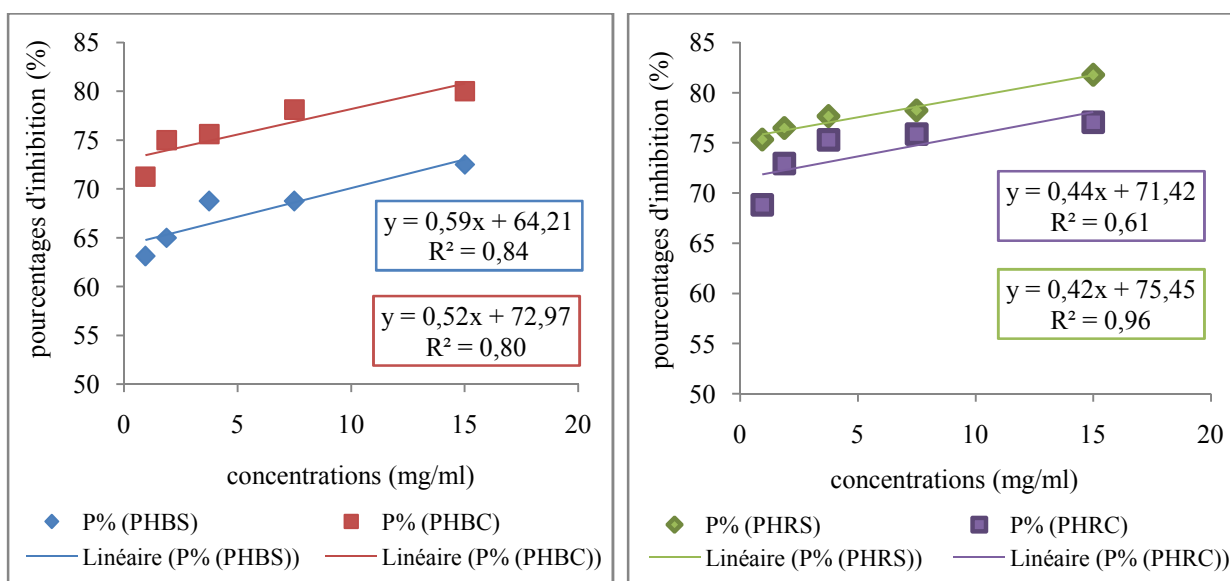


Figure 15. Taux d'inhibition extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Moniliella sp.*

Pour une concentration de 15 mg/ml, les extraits polyphénoliques des échantillons sains des deux variétés d'haricot sec présentent des taux d'inhibition supérieurs à 50% sur le genre *Rhizopus* ce dernier s'est caractérisé par une diminution de la sporulation (Annexe 07). Pour les autres concentrations, ce genre s'est révélé limité et les extraits polyphénoliques sont dits moyennement actifs (Figure 16).

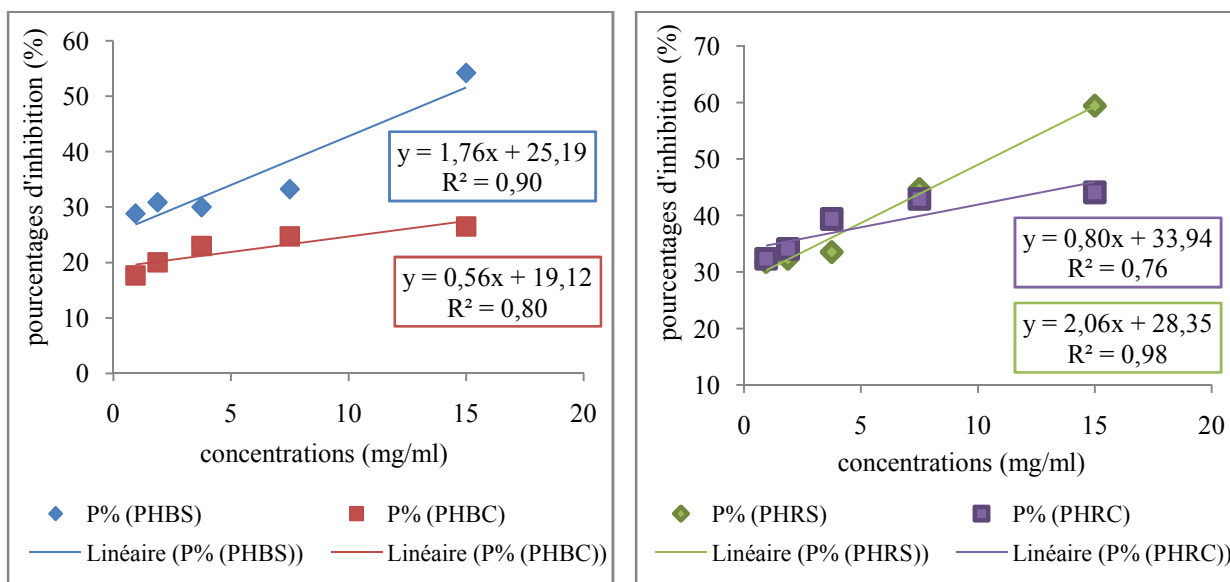


Figure 16. Taux d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Rhizopus sp.*.

Les souches *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* ont une croissance aléatoire ce qui nous a empêché de calculer leurs taux d'inhibition, les résultats obtenus sont indiqués dans les figures 17 et 18 où nous remarquons clairement un changement de la couleur.

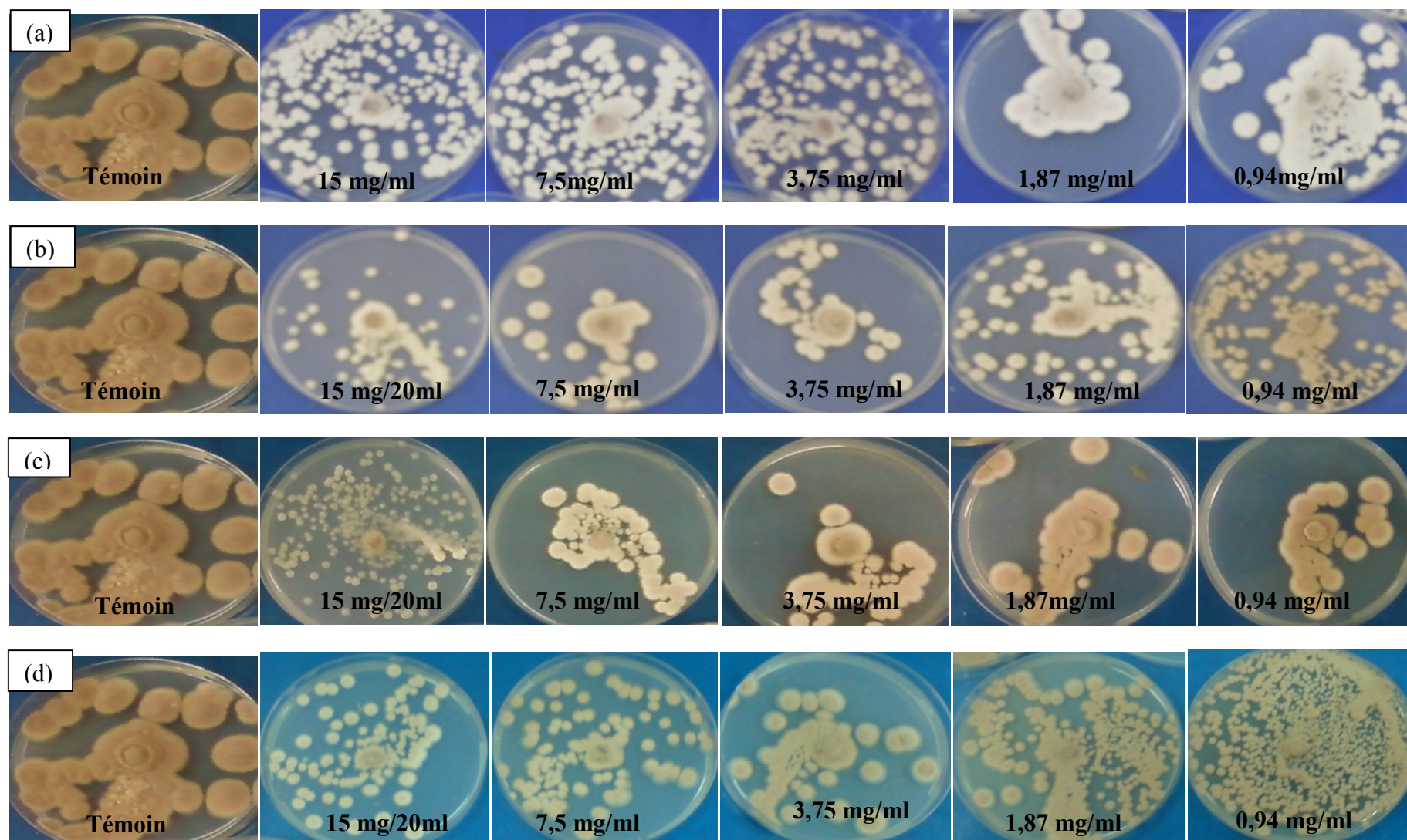


Figure 17. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Penicillium* sp. (a): PHRS, (b): PHRC, (c): PHBS, (d) : PHBC.

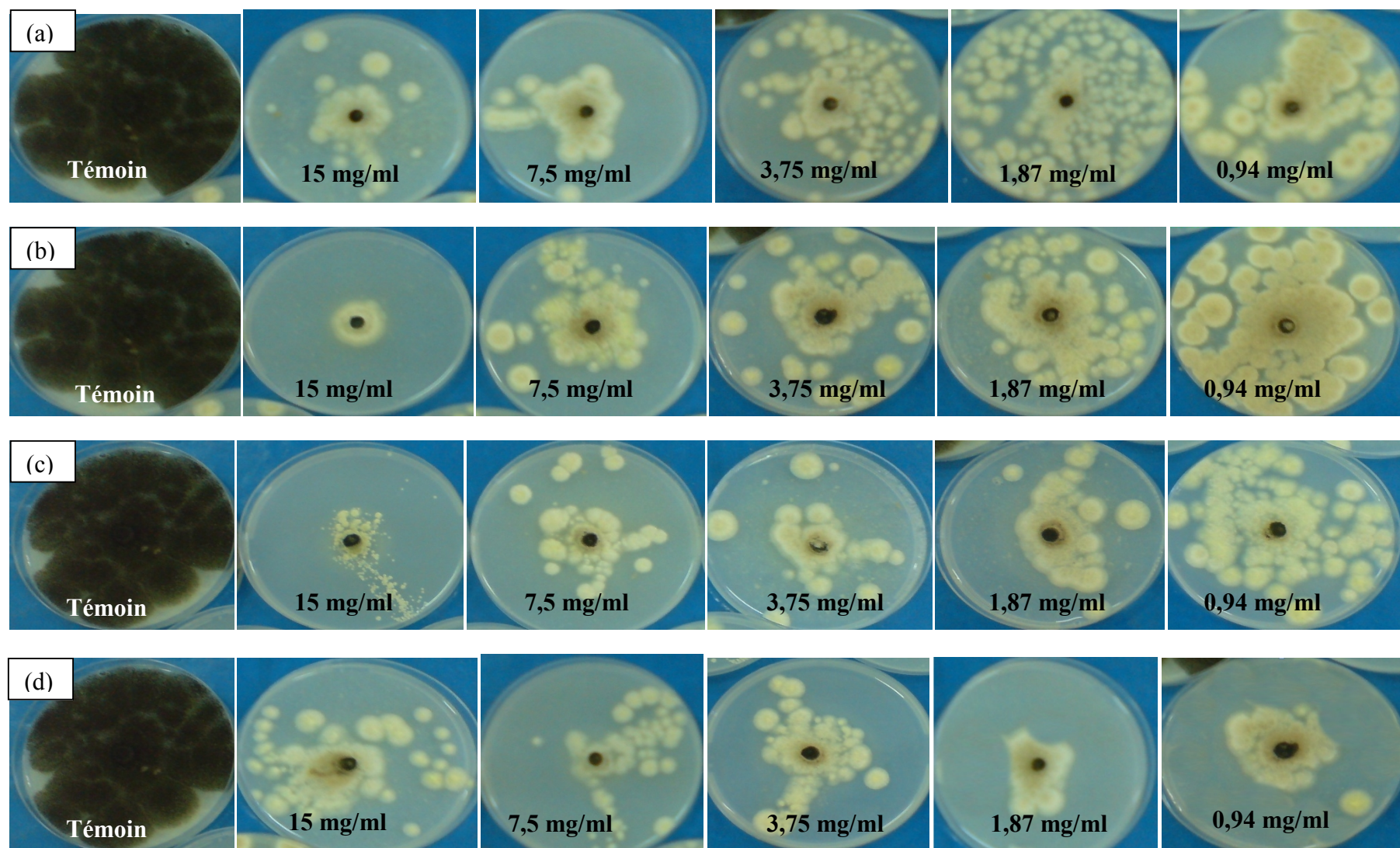


Figure 18. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Aspergillus sp.* (a): PHRS, (b): PHRC, (c): PHBS, (d) : PHBC

8. 2. Détermination des index antifongiques (IA₁₀₀)

Les IA₁₀₀ déterminés graphiquement sont récapitulés dans le tableau 19.

Tableau 19. Récapitulation des index antifongiques (IA₁₀₀) des extraits polyphénoliques des échantillons d'haricot sec.

Souches	IA ₁₀₀ (mg/ml)			
	PHRS	PHRC	PHBS	PHBC
<i>Alternaria sp.</i>	73,93	43,10	91,10	123,09
<i>Aspergillus sp.</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Fusarium sp.</i>	89,5	76,29	195,46	158,95
<i>Moniliella sp.</i>	58,45	64,95	60,66	51,98
<i>Penicillium sp.</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Rhizopus sp.</i>	34,78	82,57	42,50	144,43

ND : Non Déterminé

D'après les résultats obtenus, les souches testées n'ont pas le même IA₁₀₀. Les IA₁₀₀ des souches appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* n'ont été pas déterminés à cause de la dispersion des spores, par conséquent, nous n'avons pas pu mesurer leurs diamètres.

Malgré l'existence des taux d'inhibition relativement faibles chez certaines souches, les résultats obtenus prouvent l'existence d'une activité antifongique contre les souches testées. Donc, il est intéressant d'estimer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations fongicide (CF) et fongistatique (CFS).

8. 3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) doivent être calculées dans le but de définir l'efficacité antifongique des extraits polyphénoliques (Tiwari *et al.*, 2009). Les résultats sont consignés dans le tableau 20.

Tableau 20. Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) des extraits polyphénoliques d'haricot sec en milieu liquide.

Souches	CMI (mg/ml)			
	PHRS	PHRC	PHBS	PHBC
<i>Alternaria sp.</i>	30	30	15	30
<i>Aspergillus sp.</i>	30	30	30	30
<i>Fusarium sp.</i>	30	30	30	30
<i>Moniliella sp.</i>	1,87	7,50	15	15
<i>Penicillium sp.</i>	15	30	15	30
<i>Rhizopus sp.</i>	15	30	15	30

La concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la plus basse concentration de polyphénols qui a eu comme conséquence l'inhibition complète de la croissance des mycètes (Jong *et al.*, 2010), est comprise entre 1,87 à 30 mg/ml pour les extraits polyphénoliques d'haricot rouge sain, entre 7,5 à 30 mg/ml pour les extraits polyphénoliques d'haricot rouge contaminé et entre 15 à 30 mg/ml pour les extraits polyphénoliques d'haricot blanc sain et les extraits polyphénoliques d'haricot blanc contaminé. Les souches du genre *Moniliella* se sont avérées les souches fongiques les plus sensibles aux extraits polyphénoliques étudiés notamment à ceux d'haricot rouge sain (CMI=1,87 mg/ml).

8. 4. Concentrations fongistatique et fongicide

Les concentrations fongistatique (CFS) et fongicide (CF) exprimées en mg/ml sont présentées dans le tableau 21.

Tableau 21. Concentrations fongistatique (CFS) et fongicide (CF) en mg/ml des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur les souches isolées.

Souches	CF	CFS	CF	CFS	CF	CFS	CF	CFS
	PHRS		PHRC		PHBS		PHBC	
<i>Alternaria sp.</i>	30	ND	ND	30	30	15	30	ND
<i>Aspergillus sp.</i>	30	ND	30	ND	30	ND	30	ND
<i>Fusarium sp.</i>	30	ND	30	ND	30	ND	30	ND
<i>Moniliella sp.</i>	3,75	1,87	7,5	ND	15	ND	15	ND
<i>Penicillium sp.</i>	ND	15	ND	15	30	15	ND	30
<i>Rhizopus sp.</i>	15	ND	30	ND	30	15	ND	30

ND: Non Déterminée

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer des activités variées des extraits polyphénoliques d'haricots secs sur les souches testées. Les extraits polyphénoliques d'haricot rouge sain révèlent des activités fongistatiques sur les souches fongiques à 15 mg/ml pour *Penicillium sp.* et 1,87 mg/ml pour *Moniliella sp.*. Les polyphénols d'haricot rouge contaminé et d'haricot blanc sain sont fongistatiques à 15mg/ml sur *Penicillium sp.* et à 30 mg/ml et 15 mg/ml respectivement sur *Alternaria sp.*. Les extraits polyphénoliques d'haricot blanc contaminé sont fongistatiques sur *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* à 30 mg/ml.

D'après les résultats de l'activité antifongique, des extraits polyphénoliques des grains entiers broyés d'haricots secs, réalisée par la méthode du contact direct, les souches étudiées n'ont pas la même sensibilité. Ceci serait dû à la nature de la paroi des souches fongiques composée d'un réseau complexe de protéines et de polysaccharides et qui varie en composition selon les espèces fongiques (Yen et Chang, 2008). La perturbation de cette matrice par adsorption des composés phénoliques suit à la complexation polyphénols/polysaccharides membranaires, peut avoir comme conséquence une réduction de la fluidité des couches internes et externes de la paroi qui devienne défectueuse et sensible à la lyse osmotique des agents antifongiques (Domineco *et al.*, 2005)

En outre, l'activité antifongique des extraits polyphénoliques pourrait également être due au fait que certains composés polyphénoliques se lient aux protéines des microorganismes, ce qui bloque leurs activités enzymatiques (Mohamed Sham *et al.*, 2010). À la quelle peuvent s'ajouter également l'inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN (Hadi, 2004).

D'après Wiley (2005), la couleur caractéristique constatée de beaucoup des moisissures est due à la pigmentation des conidiums. En conséquence, le changement de la couleur des souches *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* et *Penicillium sp.* pourrait être dû à l'effet des extraits polyphénoliques des grains d'haricot sec sur les conidiums. Plusieurs auteurs, notamment Sharma *et Tripath* (2007), ont constaté que les extraits végétaux peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

La toxicité des tanins, groupe phénolique le plus largement distribué dans les haricots, vis-à-vis les moisissures est un fait bien établi soit par des expérimentations *in vitro* portant sur la réduction de la croissance des champignons filamenteux y compris quelquefois un blocage ou un ralentissement de la germination des spores soit par des approches biochimiques par action sur la respiration des moisissures (Macheix *et al.*, 2005).

En dehors des tanins, de très nombreux composés phénoliques simples d'haricot sec (acide férulique, cinnamiques, flavonoïdes, etc.) présentent également une activité antifongique. Là encore, les composés phénoliques peuvent agir soit directement en bloquant la croissance des moisissures (Macheix *et al.*, 2005) soit indirectement en inhibant certains enzymes extracellulaires, qu'elles utilisent pour pénétrer dans les grains, comme les cellulases et les

pectinases (Chérif *et al.*, 2007). Les mêmes observations ont été faites par plusieurs chercheurs (Tableau 22).

Tableau 22. Quelques composés phénoliques actifs *in vitro* sur certaines mycètes.

Composés phénoliques	Moisissures cibles	Références
Acide cinnamique	<i>Alternaria, Sclerotinia.</i>	(Lattanzio <i>et al.</i> , 2001)
Acide férulique	<i>Penicillium.</i>	(Lattanzio <i>et al.</i> , 2001)
Flavonoïdes	<i>Alternaria, Penicillium.</i>	(Chérif <i>et al.</i> , 2007)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices, des concentrations fongicide et fongistatique, par la méthode de dilution en milieu liquide, confirme les résultats obtenus en milieu solide par la méthode du contact direct. Cette activité antifongique semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques, comme la présence d'un noyau aromatique et le groupement hydroxyle dans la structure des composés phénoliques (Shirazdl *et al.*, 2011).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les légumes secs figurent sans doute, parmi les matières premières les plus exposées à la contamination fongique. Le développement fongique sur ces substrats peut avoir plusieurs conséquences: altération des propriétés organoleptiques, diminution des qualités nutritives, apparitions de maladies ou accumulation de composés toxiques. Les polyphénols figurent parmi les constituants du grain, pouvant jouer un rôle dans sa défense contre le stress biotique et abiotique. Ils ont suscité depuis quelques années un intérêt croissant de la part des industriels de l'agro-alimentaire.

Cette étude a été conduite dans le but d'évaluer la teneur en polyphénols totaux des grains entiers de deux variétés d'haricot sec (blanche et rouge), 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.

La première analyse indispensable était l'évaluation du taux d'humidité des grains, elle nous a permis de révéler des valeurs plus élevées dans les lots supposés contaminés. En général, ces taux sont favorables au développement des moisissures qui sont des microorganismes xérotolérants.

L'analyse mycologique effectuée sur nos échantillons nous a permis d'isoler 43 souches à partir des deux variétés d'haricots secs analysées. Le taux de contamination le plus élevé est observé chez la variété blanche qui semble être plus sensible aux attaques fongiques. La purification des souches isolées nous a donné la possibilité d'identifier six genres de moisissures à savoir : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Moniliella*, *Penicillium* et *Rhizopus*, avec une dominance du genre *Penicillium* dans les deux variétés. Les souches appartenant à ce genre sont qualifiées de moisissures de stockage.

Les résultats d'extraction et du dosage des polyphénols totaux ont montré que leur teneur n'est pas stable, et varie beaucoup avec la variété, elle a été plus importante pour la variété rouge que pour la variété blanche. Quant à la différence intra variétale, les échantillons sains sont plus riches en polyphénols totaux que les échantillons contaminés.

La recherche d'éventuelles corrélations entre le taux de contamination, l'humidité et la teneur en polyphénols totaux des différents échantillons d'haricot sec, indique une corrélation positivement significative entre le taux d'humidité et le taux de contamination des grains. Par contre, le taux de contamination est corrélé négativement et d'une manière significative avec la teneur en polyphénols.

Le test antifongique, réalisé par la méthode de contact direct, des extraits polyphénoliques vis-à-vis les six souches isolées et testées a montré un effet antifongique. Ce pouvoir a été variable en fonction de la souche et de la dose appliquée. Les souches appartenant aux genres *Moniliella* et *Alternaria* semblent être les plus sensibles, où tous les extraits polyphénoliques ont exercé une inhibition supérieure à 50% de leurs croissances.

La méthode de dilution a confirmé les résultats de la méthode du contact direct. Les souches du genre *Moniliella* se sont avérées les souches fongiques les plus sensibles aux extraits polyphénoliques étudiés en particulier ceux de la variété rouge saine. Ces extraits ont révélé des activités fongistatiques mais variables selon la souche et la concentration considérées (15 mg/ml pour *Penicillium sp.* et 1,87 mg/ml pour *Moniliella sp.*). Les extraits polyphénoliques de la variété rouge contaminée et la variété blanche saine sont aussi fongistatiques et variables selon la souche et la concentration considérées (15mg/ml sur *Penicillium sp.* et à 30 mg/ml et 15 mg/ml respectivement sur *Alternaria sp.*). Les extraits polyphénoliques de la variété blanche contaminée sont fongistatiques sur *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* à 30 mg/ml.

Toutes les concentrations des extraits polyphénoliques appliquées ont empêché partiellement ou complètement la croissance des moisissures testées. Les résultats obtenus indiquent que les souches les plus sensibles sont *Alternaria sp.*, *Moniliella sp.* et *Rhizopus sp.*, par contre les souches *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* sont les plus résistantes.

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie afin d'identifier les espèces des souches isolées, de quantifier et de caractériser la nature des composés polyphénoliques existant dans les différentes couches histologiques du grain d'haricot sec, 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.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad M-J., Ansuategui M. et Bermejo P., 2007. Active antifungal substances from natural sources, *ARKIVOC* (VII): 116-145.
- Abdel Massih M., 2007. Moisissures: identification, sources de contamination et moyens de lutte. *Pôle technologique agroalimentaire*: 3.
- Alavi S-H-R., Yassa N. et Fazeli M-R., 2005. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Peucedanum ruthenicum* M. Bieb. Fruits. *SHR IJPS* 1 (4): 217-222.
- Alcamo E-I., 1984. Fundamentals of Microbiology. *Addison Wesley publishing company*, London: 310-341; 617-699.
- Aparicio F-X., Manzo-Bonilla L. et Loarca-Piña G., 2005. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus Vulgaris* against aflatoxin B1. *Journal of the Science of Food* (70): 73-78.
- Arkoyld W-R. et Daughy J., 1982. Les graines de légumineuses dans l'alimentation humaine. *FAO*: 152.
- Ausubel F-M., 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved, *Nature Immunology* (6): 973-79.
- Badillet G., De Briève C. et Guého E., 1987. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique II, *VARIA*: 153-155.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J-C. et Pinkas M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung/Drug Research*. 46 II (11): 1086 - 1089.
- Bajpai V-K., Shukla S. et Kang C-S., 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology, Elsevier* (99): 8903–8908.
- Bajpai V-K., Shukla S. et Kang C-S., 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides*. *Journal. American. Oil. Chemistry. Soc* (87): 327-336.
- Basset T., 2009. Dégradation biologique. *BNF. Bussy Saint Georges* : 04.
- Batawita K., Kokon K., Akpagona K., Koumaglo K. et Bouchet P., 2002. Activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togolaise: *Conyza aegyptiae*. Cité par Akroum S (2006), *mémoire de magister*, université de Constantine: 58.
- Baudoin J-P., Crabbé J., Béatrice L. et Béatrice L., 2004. Interspecific hybridization with *Phaseolus vulgaris* L.: embryo development and its genetics. *Research Signpost*: 349-364.

- Baudoin J-P., Silué S. et Jacquemin J-M., 2011. Utilisation des mutations induites pour l'étude de l'embryogenèse chez le haricot *Phaseolus vulgaris* L. et deux plantes modèles, *Arabidopsis thaliana* et *Zea mays* L. *Biotechnology. Agronomy. Soc. Environment*: 195-205.
- Beninger C-W. et Hosfield G-L., 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (51): 7879-7883.
- Beta T., Nam S., Dexter J-E. et Sapirstein H-D., 2005. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4): 90-393.
- Boiron P., 1996. Organisation et biologie des champignons. *Nathan*: 13-69.
- Botton B., Breton A., Fèvre 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, *Masson*, Paris: 349P.
- Bouayed J., Rammal H., Younos C., Dicko A. et Soulimani R., 2008. Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Springer*. France : 4.
- Bouchet P-H., Guignard J-L et Vihard J., 1999. Les champignons mycologie fondamentale et appliqué. *Masson*: 36-45.
- Bouchet P., 2005. Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. *Masson*: 1- 23-25.
- Boudra H., 2002. La contamination par les moisissures et les mycotoxines des fourrages conservés signification et prévention, *INRA*: 11.
- Bourgeois C-M. et Larpent L-P., 1996. Microbiologie Alimentaire, les fermentations alimentaires. Tome 2. *Lavoisier*: 17-19.
- Bousseboua H., 2005. Eléments de microbiologie. *Campus club*, n°2: 14.
- Braga F-G., Bouzada M-L-M., Fabri R-L., Matos M-O., Moreira F-O., Scio E. et Coimbra E-S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 396-402.
- Branger A., Richer M-C. et Roustel S., 2007. Alimentation, sécurité et microbiologie. *Educagri*, Dijon: 32-33.
- Brochard G. et Le Bâcle C., 2009. Mycotoxine en milieu de travail : origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines, dossier médico-technique n°119. *Département études et assistance médicales, INRS*: 292.
- Brownlee H-E., Hedger J. et Scott I-M., 1992. Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Plant Pathology* (40): 227-232.

- Bulter M-J. et Day A-W., 1998. Fungal melanins. *Canadien Journal Microbiology*. 44: 1115-1136.
- Cahagnier B., Dragacc S., Frayssinet C., Frémy J-M., Hennebert G-L., Lesage-Meessen L., Multon J-L., Richard-Molard D. et Roquebert M-F., 1998. Moisissures des aliments peu hydratés. Cité par Nguyen M-T-M (2007). *Thèse doctorat*, institut national polytechnique de Toulouse: 147P.
- Cahagnier B. et Rrichard M-D., 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés. *Technologie et Documentation*: 140-158.
- Cahagnier R-B., 1996. Céréales et produits dérivés, *Tec et Toc*, Lavoisier, Paris : 392-413.
- Cairns-Fuller V., Aldred D. et Magan N., 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of Microbiology*: 1215-1221.
- Cardador-Martinez A., Loarca-Pina G. et Oomah B-D., 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (50): 6975-6980.
- Castegnaro M. et Pfohl-Leszkowicz A., 2002. Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contaminants* .19 (3): 282-302.
- Catanzariti A-M., Dodds P-N. et Ellis J-G., 2007. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiology. Lett.*; 269: 88-181.
- Cazaux M., 2009. Etude de la résistance de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* à *Colletotrichum trifolii*, agent de l'anthracnose. *Thèse de doctorat*. Université de Toulouse: 178 P.
- Chabasse D., Bouchra J-P., De Gentile L., Brun S., Cimon B. et Penn P., 2002. Les moisissures d'intérêt médical, cahier de formation N° 25, *Bioforma*, Paris: 160.
- Chahardehi A-M., Ibrahim D. et Sulaiman S-F., 2010. Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of *Pileamicrophylla*. *International Journal of Microbiology*: 6.
- Champion R., 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. *INRA*: 20-26.
- Chang C-W., Chang W-L., Chang S-T. et Cheng S-S., 2008. Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research* 42: 78-286.
- Charles M. et Benbrook P-D., 2005. Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances scientifiques. *The Organic Center*: 10.

- Charpentier J-P. et Boizot N., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Amélioration génétique et physiologie forestières. *INRA*: 79.
- Chérif M., Arfaoui A. et Rhaïem A., 2007. Phenolic compounds and their role in biocontrol and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection* (2): 7-21.
- Chisholm S-T., Coaker G., Day B. et Staskawicz BJ., 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* (124): 803-14.
- Christensen C-M., 1994. Mycologie du blé tendre : Qualité technologique du grain et conséquences sur les produits finis. Vol 7. N° 1: 27-32.
- Christensen C-M., Meronuk R-A. et Sauer D-B., 1982. Microflora (9), *American association of cereal chemists*: 219-240.
- CIAT (Centre International de l'Agriculture Tropical)., 2003. De nouvelles variétés de haricot pour les agriculteurs éthiopiens. *Temps fort*: 2.
- Cowan M-M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
- Cronk Q., Ojeda I. et Pennington R-T., 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Cur Opin Plant Biol* 9: 99-103.
- Cruz J-F. et Diop A., 1989. Génie agricole et développement, techniques d'entreposage. *FAO*, Italie: 7.
- Cup J-L. et Legnaud-Rouand C., 1992. Les graines de légumineuses, *ESF*, Paris: 941-96.
- D'Halewyn M-A., Leclerc J-M., King N., Bélanger M., Legris M. et Frenette Y., 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, Document synthèse Tiré de : Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, *Institut national de santé publique du Québec*: 16.
- Daniel G., Debouk I-N-G. et Rigoberto H., 1987. Morphologie de la plante du haricot sec (*Phaseolus vulgaris* L.), *CIAT*: 56.
- De Aguirre L., Hurst S-F., Choi J-S., Shin J-H., Hinrikson H-P. et Morrison C-J., 2004. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-enzyme immunoassay, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (8): 3495-3504.
- De Lucia M. et Assennato., 1992. L'après récolte des grains. *FAO*. Rome: 72.
- Debete J-M., 2005. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (*Caesalpinaceae*) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. *Thèse de doctorat*. Université de Bamako: 316 P.

- Dehimat L., 1990. Etude des mycotoxines sécrétées par les moisissures contaminant les céréales stockées dans la région de l'est algérien. *Thèse magister INS*. Université de Constantine: 128.
- Derwich E., Benziane Z. et Boukir A., 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. Journal of Agricultural and Biology*. 6 (3):191-198.
- Dinelli G., Bonetti A., Minelli M., Marotti I., Catizone P. et Mazzanti A., 2006. Content of flavonols in italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chemistry* (99): 105-114.
- Dixon R-A. et Paiva N-L., 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism, *Plant cell* (7): 1085-1097.
- Djebali N., 2008. Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées: *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. *Thèse de doctorat*. Université de Toulouse. 209 P.
- Domenico T., Francesco C., Maria G-S., Vincenza V., Mariateresa C-D., Antonella S., Gabriela M. et Giuseppe B., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 : 2474-2478.
- Doumandji A., Doumandji S. et Doumandji M-B., 2003. Le stockage et la lutte contre les ennemis des céréales. *Séminaire- la minoterie et les industries céréalières* : 4-14.
- Drevon J-J., 2009. Coopération sur le thème: Efficacité d'utilisation du phosphore et fixation symbiorhizobienne d'azote dans la culture du haricot (dans le cadre du programme Tassili N° 08MDU721). *Compte rendu de missions, INRA*: 6.
- Drewnowski A. et Gomez-Carneros C., 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *American Journal of Clinical Nutrition* (72): 1424-1435.
- DSASI., 2009. Direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information, Superficie et production des légumes secs en Algérie (2006-2009).
- Duron L., 1999. Le transport maritime des produits céréaliers, *mémoire pour dess*, université Marseille: 81.
- Ebrahimi N-S., Hadian J., Mirjalili M-H., Sonboli A. et Yousefzadi M., 2008. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry* (110) : 927-931.
- Ekoumou C., 2003. Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. *Thèse doctorat*. Université de Bamako: 168.

- Esekhiagbe M., Uzuazokaro Agatemor M-M. et Agatemor C., 2009. Phenolic content and antimicrobial potentials of *Xylopi aethiopica* and *Myristica argentea*. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, Vol. 28, N° 2: 159-162.
- FAO et OMS., 2007. Codex alimentarius : Céréales, légumes secs, légumineuses et matières protéiques végétale. *Programme mixte FAO/ OMS sur les normes codex pour certains légumes secs*. Rome: 13-14.
- FAO., 1984. Perte de qualité des graines alimentaires après la récolte, *étude FAO alimentation et nutrition*. Rome: 17.
- FAO., 1994. Etude FAO, Forêts. *Forest service*, Rome: 12-16.
- Feillet P., 2000. Le grain de blé composition et utilisation. *INRA*, Paris: 53.
- Feliachi K., 2006. Rapport national sur l'état des Ressources phytogénétiques pour L'alimentation et l'agriculture, *INRAA*: 68.
- Ferrari J., 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des *Thymelaeaceae* et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. *Thèse doctorat*. Université de Lausanne: 320 P.
- Flamini G. et Luigi Cioni P., 2003. Activity of plant extracts, essential oils, and pure compounds against fungi contaminating foodstuffs and causing infections in human beings and animals: A six-year experience (1995-2000). *Food products press: Crop Science*. New York: 279-297.
- Fleuriet A. et Macheix J-J., 2003. Phenolics acids in fruits and vegetables. *Marcel Dekker*, New York: 1-41.
- François V., 2004. Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de détérioration des céréales, *thèse de doctorat*, Université de Limoges. 360 P.
- Galtier P., Loiseau N., Oswald I-P. et Puel O., 2005. Toxicologie des mycotoxines: dangers et risques en alimentation humaine et animale Bull. *Academy. Veterinary*, Tome 159, N°1. France: 12-15.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and Vegetable samples. *Molecules* (15): 8813-8826.
- Gepts P., Beavis WD., Brummer EC., Shoemaker RC., Stalker HT., Weeden NF. et Young ND., 2005. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiology* 137: 1228-1235.
- Godon B. et Loisel W., 1997. Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales, *Technologie et Documentation*, Paris: 819 P.

- Goix J., 1986. La bruche du haricot. *Revue Phytoma- Défense des cultures*: 48-49.
- Golam A., Khandaker L., Berthold J., Gates L., Peters K., Delong H et Hossain., 2011. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American Journal of Food and Technology*. 6: 385-394.
- Gonzalez de Mejia E., Castano-Tostado E. et Loarca-Pina G., 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research* (441): 1-9.
- Graham P-H. et Vance CP., 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877.
- Granito M., Paolini M. et Pérez S., 2007. Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed. *LWT Food Science and Technology*. (41): 994-999.
- Guiraud J-P., 2003. Microbiologie alimentaire. *Duond*, Paris. 651 P.
- Hadi M., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro- oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse doctorat*. Université Louis Pasteur: 155 P.
- Hageskal G., Knutsen A-K., Gaustad P., de Hoog G-S. et Skaar1 I., 2006. Diversity and significance of mold species in norwegian drinking water, *Appl. Environment. Microbiology*. 72 (12): 7586-7593.
- Hahlbrock K., Scheel D., Logemann E., Nurnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks W-R. et Schmelzer E., 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4150-4157.
- Hale A-L., 2003. Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A&M University. Genetics*: 260 P.
- Halliwell B. et Gutteridge J-M-C., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 125-126.
- Harborne J-B., 1989. General procedures and measurement of total phenolics. *Plant phenolics. Academic Press, Londres*: 1-28.
- Hawksworth D-L., Kirk P-M., Sutton B-C. et Pegler D-N., 1995. Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi. *CAB International*, United Kingdom: 616.
- Hayma J., 2004. Le stockage des produits agricoles tropicaux, *Fondation Agromisa, Wageningen*: 80.

- Hinrikson H-P., Hurst S-F., De Aguirre L. et Morrison C-J., 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, 43 (1): 129-137.
- Horbowicz M., Kosson R., Grzesiuk A. et Dębski H., 2008. Anthocyanins of fruits and vegetables, their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable Crops Res. Bull.* 5-22.
- Hossain M-A., Zhari I., Atiqur R. et Chul Kang S., 2008. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial crops and products* (27): 328–334.
- Huang D., Ou B. et Prior R-L., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Hubert J., Stejskal V., Munzbergová Z., Kubátová A., Vánová M. et Zd'árková E., 2007. Mites and fungi in heavily infested stores in the Czech Republic, *J. Econ. Entomol.* 97(6): 2144-2153.
- Hussin N-M., Muse R., Ahmad S., Ramli J., Mahmood M., Sulaiman M-R, Shukor M-A-Y., Rahman M-F-A. et Aziz K-N-K., 2009. Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (*Lecythidaceae*). *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (12): 2835-2842.
- Jard N., 1995. Les maladies des grains- Tome I. *Université. Omar Mokhtar*, LYBIE: 517-522.
- Jones G-A., Mcallister T-A., Muir A-I-D. et Cheng K-J., 1994. Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed tanins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteriat. *Applied and environmental microbiology*. (60) 4: 1374-1378.
- Jones J-D-G. et Dangel J-L., 2006. The plant immune system. *Nature*; 444: 323-29.
- Jong H., Bruce C., Campbell N., Chan K-L. et Russell J-M-A., 2010. Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. *Bfungal biology* 114: 817-824.
- Kassemi N., 2006. Relation entre un insecte phytophage et sa principale plante hôte : cas de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus*)(*Coleoptera bruchidae*). *Thèse magister*. Université de Tlemcèn: 107 P.
- Kawamura F., Shaharuddin N-A., Sulaiman O., Hashim R. et Ohara S., 2010. Evaluation on antioxidant activity, antifungal activity and total phenols of 11 selected commercial Malaysian timber species. *JARQ* 44 (3): 319-324.
- Keller S-E., Sullivan T-M. et Chirtel S., 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH, *Indust. Microbiol, Biotechnology*, 19: 305-309.

- Kellouche A. et Soltani N., 2005. Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus*, *International Journal of Tropical Insect Science* Vol. 24, No. 1: 184-191.
- Khallil A-R-M., 2001. Phytofungitoxic Properties in the aqueous extracts of some plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4 (4): 392-394.
- Krogh P., 1987. Ochratoxin A in food. Mycotoxin in food. *Academic Press*, San Diego: 97-121.
- Kuhnle G., 2003. Investigation of flavonoids and their in vivo metabolite forms using tandem mass spectrometry. *Marcel Dekker*, New York: 145-163.
- Laïb I., 2009. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. *Thèse magistère*. INATAA, Constantine: 124 P.
- Laparra, J-M., Glahn R-P. et Miller D-D., 2008. Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 10999-11005.
- Larpent J-P. et Larpent G-M., 1990. Mémento technique de microbiologie. *Tec et Doc, Lavoisier*, Paris: 78-79-81.
- Lattanzio V., Di Venere D., Linsalata V., Bertolini P., Ippolito A. et Salerno M., 2001. Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 5817-5821.
- Lee K-W., Kim Y-J., Lee H-J. et Lee C-Y., 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7292-7295.
- Leighton T., Ginther C., Fluss L., Harter W-K., Cansado J. et Notario V., 1992. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in Allium vegetables: their effects on malignant cell transformation. *American Chemical Society*, Washington: 220-238.
- Lin L-Z., Harnly J-M., Pastor-Corrales M. et Luthria D-L., 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107: 399-410.
- Lis-Balchin M., 2002. Lavender: the genus *Lavandula*. *Taylor and Francis*, London: 37-200.
- Lugasi A., Hóvári J., Sági K-V. et Bíró L., 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. 47(1-4); 119-125.
- Luthria D. et Pastor-Corrales M., 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Comp. Anal*: 205-211.

- M.A (ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement)., 1998. L'agriculture par les chiffres, *Direction des statistiques agricoles et des enquêtes économiques*.
- Macarde C., 2004. Analyse structurale et évolutive d'un cluster d'analogues de gènes de résistance chez *Phaseolus vulgaris*. *Mémoire du diplôme de l'école pratique des hautes études*. Université Paris Sud: 31 P.
- Macheix J-J., Fleuriet A. et Billot J., 1990. Fruit phenolics, *CR Press*, Boca Raton: 378 P.
- Macheix J-J., Fleuriet A. et Sarni Manchado., 2005. Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: les polyphénols en agroalimentaire, Cheynier V., Sarni Manchado P. *Lavoisier*, Paris: 510 P.
- Madi A., 2010. Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. *Thèse magister*. Université Mentouri Constantine: 116 P.
- Magan N. et Olsen M., 2004. Mycotoxines in food: Detection and control, *Woodhead Publishing in Food Science and Technology*: 190-203.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. et Jimenez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American. Journal Clin Nutr.* 79(5): 727-747.
- Markham K. et Bloor S., 1998. Analysis and identification of flavonoids in practice. In: flavonoids in health and disease, Rice-Evans C., Packer L. *Marcel Dekker*, New York: 1-34.
- Meyer A., Deiana J. et Bernard A., 2004. Cour de microbiologie générale. *J.Appl.Microbiol.* 66 (4): 1523-1526.
- Miliauskas G., Venskutonis P-R. et Van Beek T-A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.*, 85: 231-237.
- Mishra A-K. et Dubey N-K., 1994. Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Microbiology.* 60 (4): 1101-1105.
- Mohamed Sham S., Hansi H., Priscilla D. et Kavitha T., 2010. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* Vol. 1(10): 430-434.
- Mohammed Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse magistère*. Université de Tlemcen: 104 P.

- Moller B. et Herrmann K., 1982. Analysis of quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in plant material by capillary gas chromatography and high performance liquid chromatography, *Journal of chromatography* 241: 371-379.
- Moreau C., 1996. Les moisissures. In Bourgeois C-M., Mescle J-F et Succa J., 1996. *Micobiologie alimentaire. Tome 1. Lavoisier. Paris: 234-235.*
- Mujica M-V., Granito M. et Soto N., 2009. Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L.Venezuela. *Interciencia*, Vol. 34, N° 9: 650-654.
- Multon J-L., 1982. Conservation et stockage des grains et des graines et produits dérivés (Céréales, Oléagineux, Protéagineux, aliments pour animaux), *Lavoisier, Paris: 576.*
- Navarro J-M., Flores P., Garrido C. et Martinez V., 2008. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*. 96: 66-73.
- Nguyen M-T., 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam- étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. *Thèse doctorat*. Institut national polytechnique de Toulouse: 147 P.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. et Killington R., 2000. L'essentiel en microbiologie. *Berti: 210-216.*
- Nurnberger T. et Kemmerling B., 2006. Receptors protein kinases-Pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci* (11): 519-22.
- Oomah B-D., Cardador-Martinez A. et Loarca-Pina G., 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85: 935-942.
- Orturno A., Baidez A., Gomey P. et Arenas M-C., 2005. *Citrus perasidi* and *Citrus sinensis* flavonoïds: Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*, cité par Akroum S (2006). *Thèse magister*. Université de Constantine: 81 P.
- Ownagh A., Hasani A., Mardani K. et Ebrahimzadeh S., 2010. Antifungal effects of thyme, agastache and satoreja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum*. 2: 99-105.
- Parr A-J. et Bolwell P-G., 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 985-1012.

- Peterson S-W., 2006. Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3): 134-8.
- Pfohl-Leszkowicz A., 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion des risques, *Lavoisier*, Paris: 478 P.
- Pfohl-Leszkowicz A., 2001. Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. *Tec et Doc*: 3-14.
- Phattayakorn K. et Wanchaitanawong P., 2009. Antimicrobial activity of thai herb extracts against coconut milk spoilage microorganisms. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 43: 752-759.
- Pietta P., Gardana C. et Pietta A., 2003. Flavonoids in herbs. In : Flavonoids in health and disease, Rice Evans C., Packer L. *Marcel Dekker*, New York: 43-69.
- Pitt J-I. et Miscamble B-F., 1995. The normal mycoflora of commodities from Thailand. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* 23: 35-53.
- Psotová J., Lasovský J. et Vičar J., 2003. Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed.* 147(2): 147-153.
- Queiroz-Monici K-S., Costa G-E-A., Da-Silva N., Reis S-M-P-M. et De-Oliveira A-C., 2005. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*, 21: 602-609.
- Ramiro D., 2009. Caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans les réponses du caféier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). *Thèse doctorat*, Montpellier supagro: 230 P.
- Reboux G., Bellanger A-P., Roussel S., Grenouillet F. et Millon L., 2010. Revue des Maladies Respiratoires, série « pollution de l'air intérieur ». Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Elsevier Masson*, France. (27): 169-179.
- Reynoso C., Ramos G. et Loarca P., 2006. Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Research Signpost* (2). India: 37-661.
- Rhodes M-J-C., Woollorton L-S-C. et Hill A-C., 1981. Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. *Academic Press*, Londres: 193-220.
- Riba A., Sabeau N., Mathieu F. et Lebrihi A., 2005. Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. *Symposium Euro- Maghrébien sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire*, Fès.
- Ribéreau-Gayon P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod*, Paris: 254 P.

- Rice-Evans C-A., Miller N-J., Bolwell P-G., Bramley P-M. et Pridham J-B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22: 375-383.
- Rivière J., 1975. Les applications industrielles de la microbiologie. Collection sciences agronomiques. *Masson et Cie* : 31-195.
- Roquebert M-R., 1997. Les moisissures in nature, biologie et contamination. Publication scientifique de Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie, Paris. Site internet: <http://www.roquber@mnhn.fr>.
- Ross K-A., Beta T. et Arntfield S-D-A., 2009. Comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*. 113: 336-344.
- Satish S., Raghavendra M-P., Mohana D-C. et 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(1): 135-150.
- Scriban R., 1993. Biotechnologie. *Lavoisier*: 32-690.
- Serrano M., Zapata P-J., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D. et Valero D., 2010. Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry*. 118: 497-503.
- Sharma N. et Tripath A., 2007. Effects of *Citrus* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res. In press*, 345-545.
- Shirzad1 H., Hassani1 A., Ghosta Y., Abdollahi A., Finidokht R. et Meshkatalasadat M-H., 2011. Assessment of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest gray mould (*botrytis cinerea* pers.: fr.) Of kiwifruits (*actinidia deliciosa*) during storage. *Journal of plant protection research* Vol 51, N°1.
- Singleton V-L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos R-M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299: 152-178.
- Siret C., 2000. Structure des aliments. *Techniques d'ingénieur*: 11.
- Smith R., 2002. Fungal identification guide. Departement of veterinary pathology, *Texas university*: 24-26.
- Solis-Pereira S., Ernesto F-T., Gustero V-G. et Mariano-Gutierrez R., 1993. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 36-41.

- Sprent JI, et Parsons R., 2000. Nitrogen fixation in legume and non legume trees. *Field crop Resh*, 65: 183-196.
- Subrahmanyam M., Hemmady A. et Pawar S-G., 2001. Antibacterial Activity Of HoneyOn Bacteria Isolated From Wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters*. XIV (I).
- Sud D., Sharma O-P. et Sharma P-N., 2005. Seed mycoflora in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Himachal Pradesh. *Seed Res* 33: 103-107.
- Suszka B., Muller C. et Bonnet Masimbert M., 1994. Graines des feuillus forestiers : de la récolte au semis. *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*. Paris: 30-31.
- Swinny E. et Markham K., 2003. Application of flavonoid analysis and identification techniques : isoflavones (phytoestrogens) and 3-deoxyanthocyanins. In : Flavonoids in health and disease, Rice Evans C., Packer L. *Marcel Dekker*, New York: 97-122.
- Tabuc C., 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. *Thèse doctorat*. École nationale vétérinaire de Toulouse. 190 P.
- Tahani N., Elamrani A. Serghini-Caid H., Ouzouline M. et Khalid A., 2008. Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*. Vol2, N°1: 81-91.
- Tameling W-I-L. et Takken F-L-W., 2008. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur. J. Plant Pathol*: 243-55.
- Tatsadjieu N-L., Jazet Dongmo P-M., Ngassoum M-B., Etoa F-X. et Mbofung C-M-F., 2009. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus*. *Food Control*. 20:161-166.
- Taylor J-W., 1996. Ascomycota Sac Fungi Department of Plant and Microbial Biology. *University of California Berkeley*: 94720-3120.
- Thiam A-A., Drapron R. et Rhichard molard D., 1976. Causes d'altération des farines de mil et sorgho. *Ann. Technol. Agric*.25 (3): 253-271.
- Tiwari B-K., Valdramidis V-P., O'Donnell C-P., Muthukumarappan K., Bourke P. et Cullen P-J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.57: 5987–6000.
- Tseng T-C., Tu J-C. et Tzean S-S., 1995. Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario, Canada. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 36: 229-234.
- Van Sumer C-F., 1989. Phenols and phenolics acids. In: Plant phenolics. Methods in plant biochemistry, vol 1, Harborne J-B. *Academic Press*, London: 29-73.

- Vance C-P., Graham P-H. et Allan D-L., 2000. Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. *In*, Pedrosa F.O., Hungria M., Yates M.G., Newton W.E. Nitrogen fixation: from Molecules to crop productivity. *Kluwer Academic Publishers*, New York : 839-867.
- Wiley J., 2005. Essential microbiology. *Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ*, England: 481 P.
- Wulf L-W. et Nagel C-W., 1978. High pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*, *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 42-49.
- Xu B. et Chang S., 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 57: 4754-4764.
- Yen T-B. et Chang S-T., 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 99: 232-236.
- Ying Tan S., Chi Kong Y., Elad T., Raymond P-G., Ross M-W., Xingen L. et Dennis D-M., 2008. Iron bioavailability to piglets from red and white common beans (*phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*: 5008–5014.
- Yrjönen T., 2004. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. *Conference Room 513 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki*: 64.
- Zarrin M., Amirrajab N. et Nejad B-S., 2010. *In vitro* antifungal activity of *satureja khuzestanica* jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pak. J. Med. Sci*; 26 (4): 880-882.
- Zem T-L. et Fernandez M-L., 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 135: 2291-2294.

ANNEXES

Annexe 01. Photos des deux variétés d'haricots secs étudiées.

Variété blanche « *Tima* »

Variété rouge « *MGT djedida* »

Annexe 02. Composition des milieux de culture (Guiraud, 2003).

Milieu PDA

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

Glucose.....20g

Agar20g

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15mn.

pH= 4.5

Lactophénol d'AMANN

Phénol pur cristallisé.....20g

Acide lactique.....20g

Glycérine.....40g

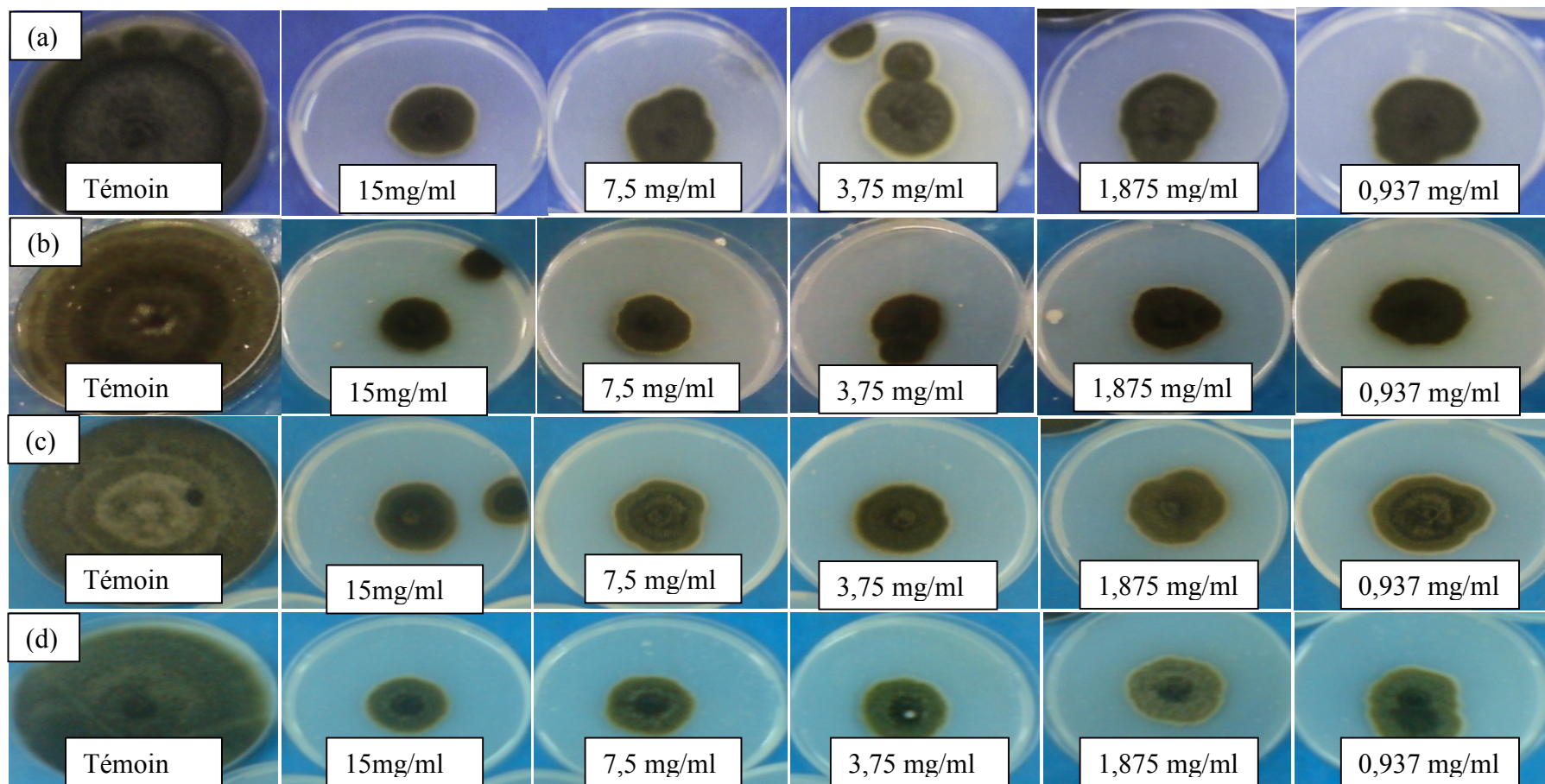
Eau distillée.....20ml

A conserver en flacon coloré à l'abri de la lumière.

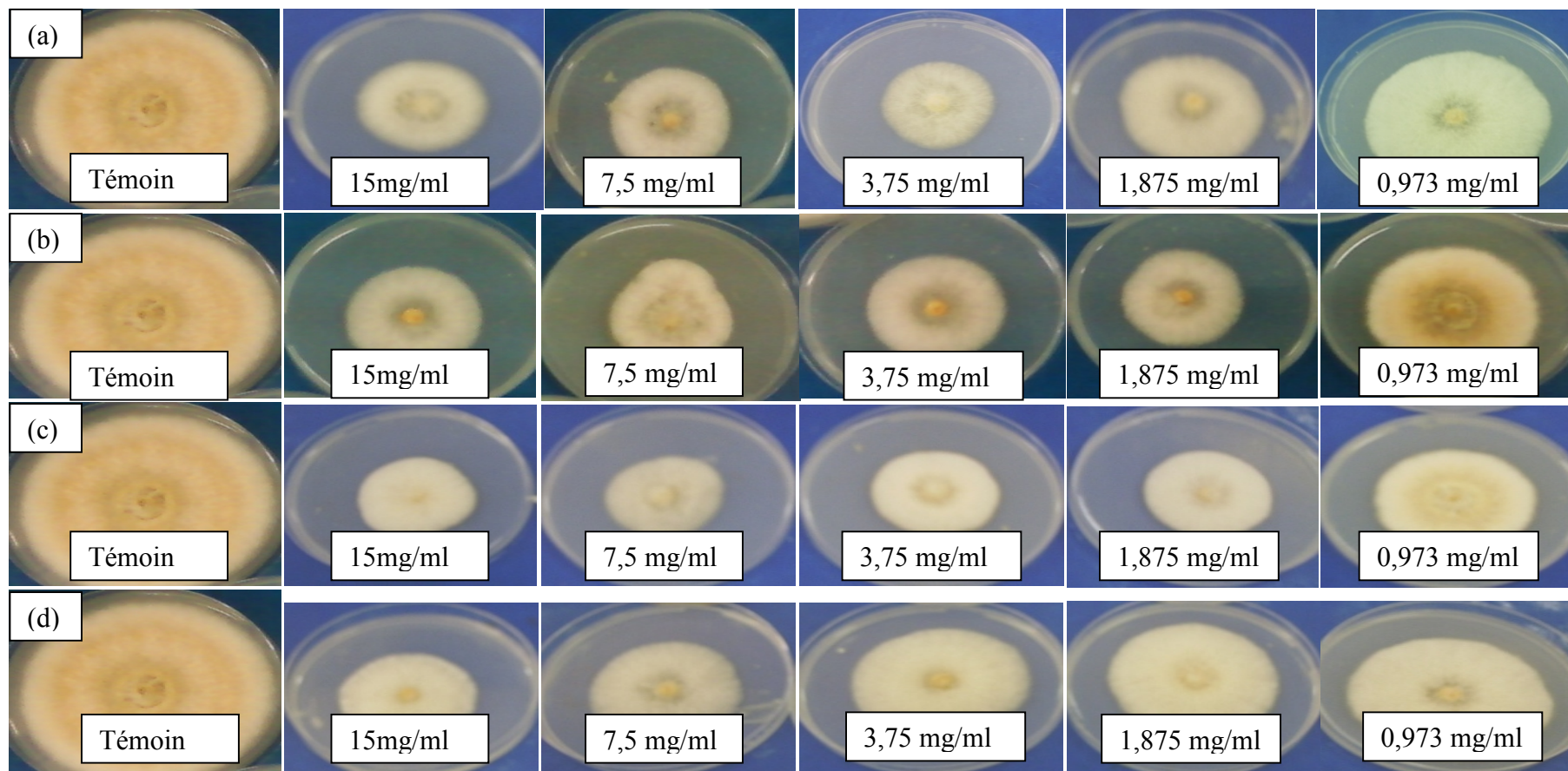
Annexe 03. Densités optiques des extraits polyphénoliques.

Extraits polyphénoliques	PHRS	PHRC	PHBS	PHBC
Densités optiques	0,55±0,03	0,52±0,01	0,46±0,07	0,37±0,01

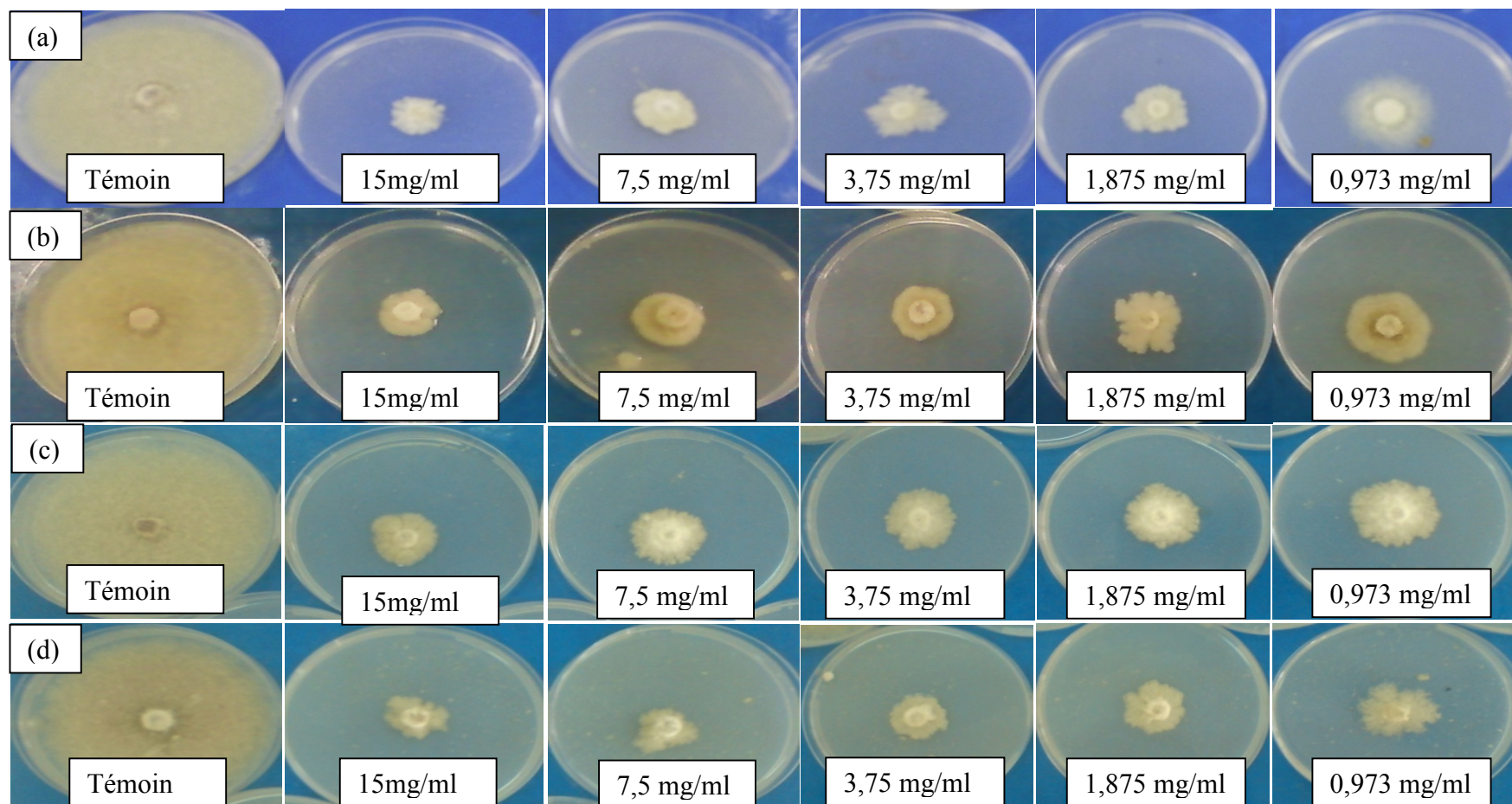
Annexe 04. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Alternaria sp.* (a): PHRS, (b): PHRC, (c): PHBS, (d) : PHBC



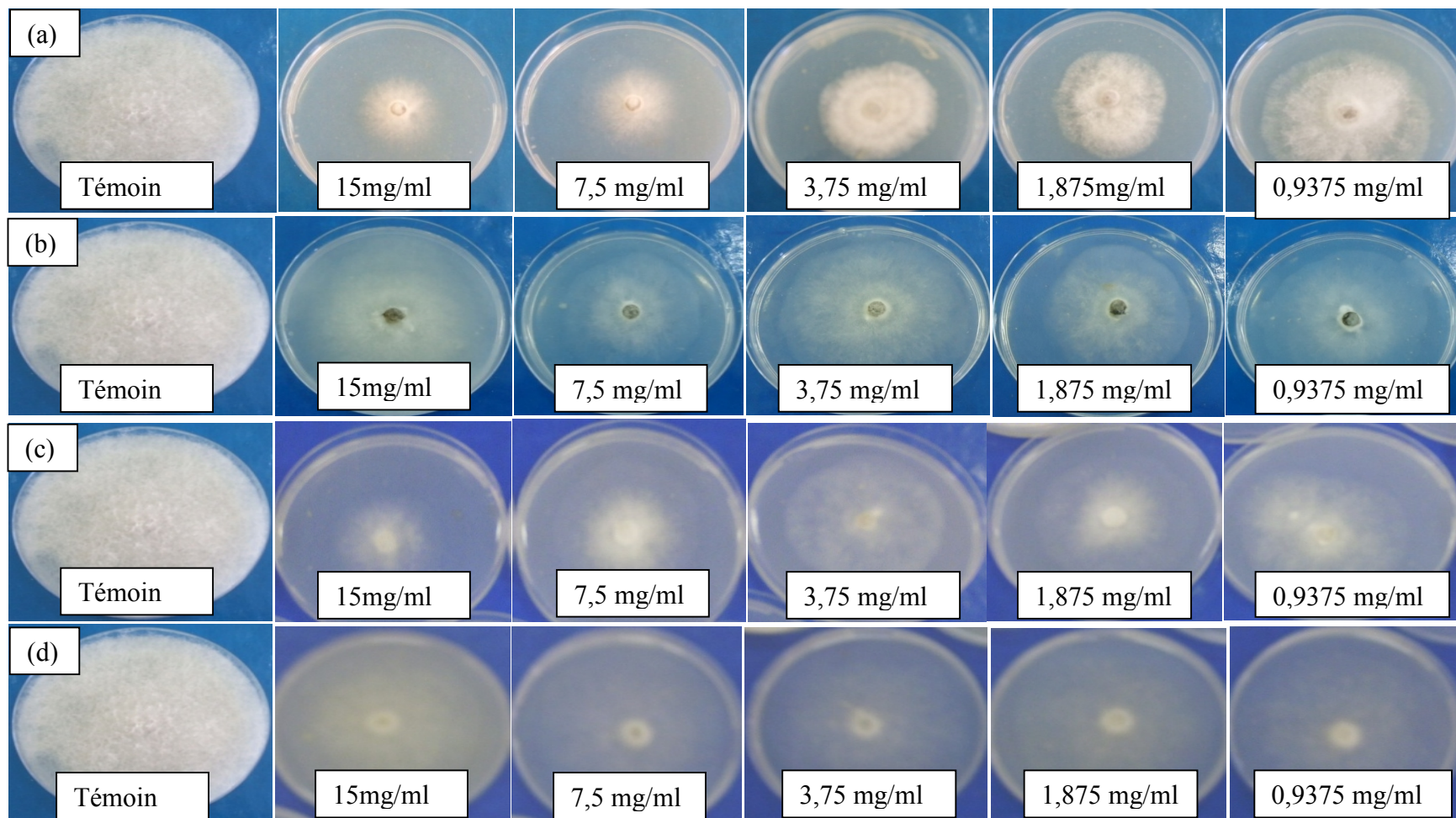
Annexe 05. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Fusarium sp.* (a): PHRS, (b): PHRC, (c): PHBS, (d) : PHBC.



Annexe 06. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Moniliella* sp. (a): PHRS, (b): PHRC, (c): PHBS, (d) : PHBC



Annexe 07. Effet d'inhibition des extraits polyphénoliques vis-à-vis la souche *Rhizopus sp.* (a): PHRS, (b): PHRC, (c): PHBS, (d) : PHBC.



Annexe 08.

A. Taux d'inhibition des polyphénols totaux d'haricots secs vis-à-vis la souche *Alternaria.sp.*.

Souche	Concentrations (mg/ml)	Pourcentages d'inhibition (%)			
		PHBS	PHBC	PHRS	PHRC
<i>Alternaria sp.</i>	15,00	62,94±0,83	65,29±0,83	63,52±1,66	75,00±0,90
	7,50	61,17±1,66	62,94±0,83	60,00±1,67	69,23±1,81
	3,75	57,64±1,66	62,35±1,66	58,82±0,00	65,38±0,00
	1,87	57,06±5,83	61,76±4,16	56,47±3,32	63,46±4,53
	0,94	56,47±1,67	59,99±6,65	53,53±5,82	62,82±1,81

B. Taux d'inhibition des polyphénols d'haricots secs vis-à-vis la souche *Fusarium sp.*.

Souche	Concentration s (mg/ml)	Pourcentages d'inhibition (%)			
		PHBS	PHBC	PHRS	PHRC
<i>Fusarium sp.</i>	15,00	49,37±0,88	18,75±1,76	39,37±0,88	45,29±4,16
	7,50	47,50±1,77	16,25±0,00	31,25±0,00	42,35±0,00
	3,75	46,87±4,42	13,75±1,77	30,62±0,88	39,41±2,50
	1,87	45,87±0,88	12,50±0,00	28,75±5,30	34,12±0,00
	0,94	45,00±01,77	10,00±0,00	26,87±0,88	32,35±4,16

C. Taux d'inhibition des polyphénols d'haricots secs vis-à-vis la souche *Moniliella sp.*.

Souche	Concentrations (mg/ml)	Pourcentages d'inhibition			
		PHBS	PHBC	PHRS	PHRC
<i>Moniliella sp.</i>	15	72,5±0	80±1,77	81,76±0,83	77,06±0,83
	7,5	68,75±0	78,12±4,42	78,23±0,83	75,88±0,83
	3,75	68,75±5,30	75,62±0,88	77,64±1,66	75,29±0
	1,87	65±1,77	75±0	76,47±0	72,94±1,67
	0,94	63,1±2	71,25±1,77	75,32±1,62	68,82±2,50

D. Taux d'inhibition des polyphénols d'haricots secs vis-à-vis la souche *Rhizopus sp.*.

Souche	Concentrations (mg/ml)	Pourcentages d'inhibition			
		PHBS	PHBC	PHRS	PHRC
<i>Rhizopus sp.</i>	15,00	54,18±0,00	26,47±4,16	59,41±4,16	44,11±2,50
	7,50	33,23±1,34	24,70±1,66	44,70±4,98	42,94±0,83
	3,75	30,00±0,83	22,94±0,83	33,53±5,83	39,41±2,50
	1,87	30,85±2,04	20,00±0,00	32,35±0,83	34,12±0,00
	0,94	28,82±4,16	17,65±0,00	31,76±4,99	32,33±4,13

Résumé

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antifongique des polyphénols extraits à partir de la farine des grains entiers de deux variétés d'haricot sec, l'une de couleur blanche (*Tima*) et l'autre de couleur rouge (*MGT djedida*). La détermination du taux d'humidité des deux variétés d'haricot sec a révélé des taux favorables pour le développement des moisissures. L'isolement, la purification et l'étude microscopique des souches isolées ont permis d'identifier six genres de moisissures à savoir : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Moniliella*, *Penicillium* et *Rhizopus*. L'extraction des polyphénols totaux a été réalisée à l'aide d'un solvant polaire, et leur quantification a été basée sur la réaction de Folin Ciocalteu, le contenu totale en polyphénol a été $0,40 \pm 0,005$ mg EAG/g pour la variété rouge et $0,27 \pm 0,005$ mg EAG/g pour la variété blanche. Le test antifongique réalisé par la méthode du contact direct et la méthode de dilution, et l'index antifongique (IA_{100}) ont permis de prouver le pouvoir antifongique des polyphénols, où les souches les plus sensibles sont *Alternaria sp.*, *Moniliella sp.* et *Rhizopus sp.*. Les polyphénols les plus actifs sont les polyphénols extraits de la variété saine d'haricot rouge. À l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que les résultats obtenus sont prometteurs incitant la création de variétés à teneur élevée en polyphénols, agent conservateur, bio-efficace, naturel, et qui peut être une solution alternative de la lutte chimique pour la protection des récoltes dans les structures de stockage.

Mots clés : Polyphénols, activité antifongique, haricot sec.

Devant le jury :

Président : Pr. KABOUCHE A.

Professeur

(INATAA,UMC)

Promotrice : Dr. BARKAT M.

M.C.A.

(INATAA,UMC)

Examinatrice: Dr. BOUSHABA R.

M.C.A.

(INATAA,UMC)

Examinatrice: Dr. KHARROUB K.

M.C.A.

(INATAA,UMC)

Abstract

The aim of this study is the evaluation of antifungal activity of polyphenols extracted from two varieties of dry bean, presenting white (*Tima*) and red (*MGT djedida*) color. Determination of moisture for the two varieties showed that these grains are favorable for moulds growth. Purification and microscopic study of the isolated stocks allowed the identification of 6 moulds genera: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Moniliella*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Rhizopus*. Extraction of total polyphenols was carried by a polar solvent and their quantification was based on the reaction of Folin Ciocalteu. The total polyphenolic content was $0,40 \pm 0,005$ mg EAG/g for the red variety and $0,27 \pm 0,005$ mg EAG/g for the white variety. The antifungal activity carried by the methods of direct contact, dilution, and antifungal index (IA_{100}) made possible to prove the antifungal capacity of polyphenols, most sensitive stocks are *Alternaria sp.*, *Moniliella sp.* and *Rhizopus sp.*. The most active polyphenols are the red healthy bean polyphenols. Among this study, we can show that the promising results obtained incite creation of varieties with high percentage of polyphenols, preservative, bio-effective and natural agents, which can be an alternative solution for chemical agents used for the protection of harvests in storage structures.

Key words: Polyphenols, Antifungal activity, dry bean.

الإسم واللقب : جبالي صليحة .
الأطروحة : تأثير مركبات الفينول على مقاومة العدوى الفطرية عند الفاصولياء الجافة .
طبيعة الشهادة : ماجستير .
إختصاص : بيوتكنولوجيا غذائية .

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفاعلية المضادة للفطريات لمركبات الفينول المستخلصة من بذور فصيلتين من الفاصولياء الجافة "*Phaseolus vulgaris*". الأولى ذات لون أبيض و هي الفصيلة "*Tima*" و الثانية ذات لون أحمر فاقع و هي الفصيلة "*MGT djedida*". في ما يخص نسبة الرطوبة ، بينت لنا النتائج المتحصل عليها أن بذور الفصيلتين تحتوي على نسب يمكن اعتبارها محفزة لتكاثر الفطريات . بعد دراسة هذه الأخيرة تحت المجهر الضوئي، تمكنا من تحديد ستة أنواع و هي: *Alternaria*، *Aspergillus*، *Fusarium*، *Moniliella*، *Penicillium* و *Rhizopus*. لاستخلاص مركبات الفينول الكلية، استعملنا مذيب قطبي، و كانت الكمية المتحصل عليها، بعد إجراء تفاعل Folin ciocalteu، تتراوح ما بين 0.005 ± 0.40 مغ مكافئ حمض غليغ اغ بالنسبة للفصيلة ذات اللون الأحمر، و 0.005 ± 0.27 مغ مكافئ حمض غليغ اغ بالنسبة للفصيلة ذات اللون الأبيض. من جهة أخرى، و في ما يتعلق بدراسة الفاعلية المضادة للفطريات، بينت و أكدت لنا، طريقة التلامس المباشر، طريقة التخفيف في وسط سائل و المؤشر المضادة للفطريات (IA_{100}) أن مركبات الفينول المستخلصة تتميز بفاعلية مضادة لتكاثر الفطريات المجربة، مع وجود ثلاثة أنواع حساسة و هي: *Alternaria sp.*، *Moniliella sp.* و *Rhizopus sp.* بالخصوص اتجاه مركبات الفينول المستخلصة من الفصيلة السليمة للفاصولياء الحمراء، التي يمكن القول أنها الأكثر فاعلية. انطلاقا من النتائج المتحصل عليها ، يمكننا الاستنتاج أن مركبات الفينول لبذور الفاصولياء الجافة لها فاعلية بيولوجية هامة ضد الفطريات ، قد تمكنا من استعمالها كحافظ غذائي طبيعي في المخازن بدلا من المواد الكيميائية المستعملة وذلك من أجل تفادي تكاثر الفطريات المسؤولة عن فساد المخزون ، مع إمكانية خلق فصيلة جديدة من الفاصولياء غنية بهذه المركبات ذات الخصائص الغذائية والتكنولوجية .

الكلمات الدالة : مركبات الفينول - الفاعلية المضادة للفطريات - الفاصولياء الجافة