

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté des Sciences

**Thèse de Doctorat LMD**

Présentée par : M<sup>lle</sup> BENNACER Amel

**En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT LMD:**

**Filière :** Biotechnologie

**Option :** Biotechnologie

**Thème**

---

**Etude phytochimique et criblage des activités antifongique et entomocide des feuilles de deux plantes arboricoles cultivées : le Noyer et l'Olivier.**

---

**Devant le jury composé de :**

<u>Nom et prénom</u>	<u>Grade</u>	<u>Etablissement</u>	<u>Qualité</u>
M <sup>me</sup> ACHEUK Fatma	Professeur	U.M.B. de Boumerdes	Présidente
M <sup>me</sup> SAHIR-HALOUANE Fatma	Professeur	U.M.B. de Boumerdes	Directrice
M <sup>me</sup> AITSLIMANE- AITKAKI Sabrina	Professeur	U.M.B. de Boumerdes	Co-directrice
M <sup>r</sup> RIBA Amar	Professeur	U.M.B. de Boumerdes	Examineur
M <sup>me</sup> MEDJDOUB- BENSAAD Ferroudja	Professeur	U.M.M. de Tizi Ouzou	Examinatrice
M <sup>me</sup> CHERIF Hamida Saida	Professeur	U.S.D. de Blida 1	Examinatrice

**Année Universitaire : 2023/2024**

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie en premier lieu Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé la volonté, la patience, la force et le courage pour accomplir ce modeste travail et mes chers parents en deuxième lieu pour leur affection inépuisable et leurs précieux conseils, encouragements et soutien tout au long de mon parcours, qu'ils acceptent l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens vivement à exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude à ma directrice de thèse **Mme SAHIR-HALOUANE F.** professeure à la faculté des sciences de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et de m'avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques. Ainsi que sa grande disponibilité malgré ses responsabilités, ses conseils et son écoute qui ont permis d'améliorer les différentes parties de ce travail. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de cette thèse. Elle a toujours su me faire confiance et m'apporter l'aide nécessaire, tant sur le plan scientifique que moral.

Je tiens à exprimer mon gratitude et ma reconnaissance à ma co-directrice **Mme AITSLIMANE-AITKAKI S.** Professeure à la faculté des sciences de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes, pour son aide et son soutien. Je tiens à lui exprimer mes profonds remerciements pour la confiance qu'elle m'avait accordée.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Mr DELGADO J.P.**, professeur à la faculté de Vétérinaire, Université d'Extramadura, d'Espagne, pour son aide précieuse dans l'identification moléculaire des souches isolées.

Mes sincères remerciements vont à **Mme ACHEUK F.** Professeure à la faculté des sciences et directrice du laboratoire de recherche (Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques VALCORE), université M'hamed Bougara de Boumerdes, pour ses efforts au sein du laboratoire de recherche et pour l'honneur qu'elle m'a fait en présidant le jury de cette thèse ; qu'elle veuille bien trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude.

Mes profonds remerciements s'adressent aussi aux examinateurs **Mr RIBA A.** Professeur et Doyen à la Faculté des Sciences de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes, **Mme MEDJDOUB-BENSAAD F.** Professeure à l'université de Mouloud Maamri de Tizi Ouzou et **Mme CHERIF H.S.** Professeure à l'université Saad Dahlab Blida 1, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter l'examen de ce travail aussi, pour votre temps et vos efforts fournis pour lire et discuter mon manuscrit. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma gratitude envers le personnel administratif de département de biologie et en particulier **Mr MESSAOUDENE D.**, chef de département de biologie pour leurs écoutes et serviabilité.

Je remercie également **Mr TEFFAHI D.** chef de service et son équipe au laboratoire d'hygiène de référence de la wilaya de Blida pour leurs aides précieux.

Mes vifs remerciements s'adressent à **Mlle OUKALI Z.**, ingénieur du laboratoire VALCORE et doctorante en biotechnologie microbienne, pour son aide précieux et ses conseils tout au long de ce travail, qu'elle veuille bien trouver ici toutes mes reconnaissances.

Je tiens à remercier **Mme BENZINA F.**, Professeure à la faculté des sciences, Université M'hamed Bougara de Boumerdes, pour son aide précieux dans le financement d'une partie des produits chimiques et équipements du laboratoire, qu'elle veuille bien trouver ici toute ma gratitude.

Mes remerciements vont également à mes anciens collègues et amis pour toujours analystes physico-chimie au sein du laboratoire de contrôle de qualité à **BIOPHARM industries** pour leurs aides précieux et supports, qu'ils trouvent ici toutes mes reconnaissances.

Je remercie également **Mme MOUHOUCHE F.** Professeure à l'école nationale supérieure des sciences agronomiques d'El Harrach, Alger, pour nous avoir fournir les insectes et les dispositifs d'élevage, qu'elle trouve ici toutes mes reconnaissances.

Mes profonds remerciements s'adressent aussi à **Mme KARAOUI N.** responsable de formation et à **Mme CHAIB R.** médecin spécialiste en anatomopathologie au niveau du Centre Hopitalo-Universitaire Nafissa Hamoud, Hussein Dey, Alger (Ex : Parnet), pour leurs aides précieux et leurs disponibilités. Mes remerciements vont également à **Mr AISSAOUI M.** maître de conférences classe B à la Faculté des sciences et technologies, université de Tamanghasset, pour son aide précieux.

Ma profonde gratitude s'adresse à **Mme BEHIDJ N.** professeure à la Faculté des Sciences-Boumerdes et directrice de laboratoire Technologies Douces, Valorisation Physico-Chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité. Merci madame de m'avoir accordé l'accès à votre laboratoire et merci à tous les ingénieurs qui ont mis à ma disposition quelques appareils nécessaires à mes manipulations.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma profonde reconnaissance à tous mes enseignants du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Saad Dahlab Blida 1, je suis reconnaissante de ce qu'ils m'ont appris, c'est grâce à eux que je suis aujourd'hui ici. J'exprime un vif remerciement à mes collègues doctorants (biotechnologues et agronomes) affiliés au laboratoire VALCORE.

## الاهداء

الحمد لله والصلاة والسلام على رسول الله

بعد باسم الله الرحمن الرحيم

« يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ »

ارجو من الله عز وجل ان يحتسبني بهذا العمل طالبة للعلم خالصة النية لوجهه  
الكريم

اهدي هذا العمل المتواضع الى والديّ

الى ابي ذلك الرجل الشغوف المتعطش للعلم والمعرفة والتي زرع بذورها فينا  
منذ الصغر ها انا ذا اقطف اول ثمرات زرعك الطيب أيها الاستاذ العظيم

الى امي تلك المرأة التي طالما كانت مصدر قوتي الى من وضعتني على الدرب  
وطالما امننت بقدراتي الى التي لم تطالبني يوما بالقيام بمشاغل البيت وكان همها  
الأول والأخير دراستي هاته الدكتوراه اهديها لك يا دكتورة حياتي

حفظكما الله ورعاكما

الى سندي في هاته الدنيا من بعد الله الى اخوتي صهيب نور الهدى ونسرين شكرا  
على دعمكم اللامتناهي

الى أصدقاء دربي شكرا على دعمكم الغير مشروط

الى كل الأحبة هاته الاطروحة مهداة لكم

امال بن ناصر



# *Table de matières*

<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>

## **Chapitre I. Synthèse bibliographique**

<b>I.1. Caractéristiques générales du blé tendre .....</b>	<b>4</b>
I.1.1. Historique.....	4
I.1.2. Origine géographique .....	4
I.1.3. Origine génétique .....	5
I.1.4. Cycle végétatif .....	7
I.1.5. Classification botanique.....	7
I.1.6. Structure et Composition .....	8
I.1.6.1. Structure de la graine .....	8
I.1.6.2. Composition de la graine de blé.....	9
I.1.7. Production .....	10
I.1.7.1. Dans le monde.....	10
I.1.7.2. En Algérie .....	11
I.1.8. Méthodes et modes de stockage du blé tendre .....	12
I.1.8.1. Stockage.....	12
I.1.8.2. Modes de stockage.....	13
I.1.8.2.1. Stockage dans des silos souterrains (Matmoura).....	13
I.1.8.2.2. Stockage en vrac .....	13
I.1.8.2.3. Stockage en sac .....	14
I.1.8.2.4. Stockage en silo métallique.....	14
<b>I.2. Mycoflore du blé stocké .....</b>	<b>15</b>
I.2.1. Généralités.....	15
I.2.2. Mycoflore du champ.....	15
I.2.3. Mycoflore intermédiaire .....	16
I.2.4. Mycoflore de stock.....	16
I.2.5. Principales moisissures d'altération de blé stocké .....	16

I.2.6.1. Genre <i>Aspergillus</i> .....	16
I.2.6.2. Genre <i>Penicillium</i> .....	18
I.2.6.3. Genre <i>Fusarium</i> .....	19
I.2.6.4. Sous famille des Mucorales.....	20
I.2.7. Impact des moisissures sur le blé stocké .....	21
I.2.7.1. Altération organoleptique.....	21
I.2.7.2. Production des mycotoxines dans le blé .....	22
I.2.8. Procédé de traitement de blé stocké.....	23
I.2.8.1. Lutte chimique .....	23
I.2.8.2. Lutte physique .....	24
I.2.8.3. Lutte biologique.....	24
<b>I.3. Insectes ravageurs de denrées stockées.....</b>	<b>25</b>
I.3.1. Généralités.....	25
I.3.2. Charançon du riz « <i>Sitophilus oryzae</i> » .....	26
I.3.2.1. Morphologie .....	26
I.3.2.2. Cycle évolutif .....	26
I.3.2.2.1. Oeuf.....	26
I.3.2.2.2. Larve .....	27
I.3.2.2.3. Nymphe .....	27
I.3.2.2.4. Imago.....	27
I.3.2.3. Biologie du charançon du riz.....	28
I.3.2.4. Classification de <i>Sitophilus oryzae</i> .....	29
I.3.2.5. Origine et répartition géographique .....	29
I.3.2.6. Régime alimentaire et dégâts .....	29
I.3.2.7. Lutte contre <i>Sitophilus oryzae</i> .....	30
I.3.2.7.1. Lutte chimique .....	30
I.3.2.7.2. Lutte biologique .....	31
I.3.2.7.3 Phytostoppesticides .....	31
<b>I.4. Modèles végétales .....</b>	<b>32</b>
<b>I.4.1. Noyer commun.....</b>	<b>32</b>
I.4.1.1. Historique et origine .....	32
I.4.1.2. Etymologie .....	32
I.4.1.3. Systématique et classification botanique .....	33
I.4.1.4. Description botanique .....	33
I.4.1.5 Composition chimique .....	38

I.4.1.6. Habitats et exigences .....	39
I.4.1.7. Répartition .....	39
I.4.1.8. Vertus thérapeutiques des feuilles du Noyer commun .....	39
I.4.1.9. Propriétés biopesticides.....	39
<b>I.4.2. Olivier cultivé.....</b>	<b>41</b>
I.4.2.1. Historique et origine .....	41
I.4.2.2. Etymologie .....	41
I.4.2.3. Systématique et classification botanique .....	42
I.4.2.4. Morphologie et description botanique de l'olivier .....	42
I.4.2.5. Distribution géographique.....	45
I.4.2.6. Composition chimique .....	46
I.4.2.7. Vertus thérapeutiques des feuilles d'olivier .....	47
I.4.2.8. Propriétés biopesticides.....	47
<b>I.5. Métabolites secondaires d'origine végétale.....</b>	<b>48</b>
I.5.1. Généralités.....	48
I.5.2. Classification des métabolites secondaires .....	48
I.5.2.1. Terpènes et les stéroïdes .....	49
I.5.2.2. Composés phénoliques ou les polyphénols.....	51
I.5.2.3. Composés azotés ou les alcaloïdes .....	52
I.5.3. Rôles des métabolites secondaires.....	53

## **Chapitre II. Extraction et étude phytochimique**

II.1. Matériel et méthodes .....	54
II.1.1. Matériel.....	54
II.1.2. Méthodes .....	54
II.1.2.1. Échantillonnage.....	54
II.1.2.2. Traitement préliminaire des feuilles récoltées .....	56
II.1.2.3. Analyses physico-chimiques des poudres végétales .....	56
II.1.2.3.1. Taux d'humidité relative .....	56
II.1.2.3.2. Taux des matières organiques et inorganiques.....	57
II.1.2.4. Screening phytochimique.....	58
II.1.2.5. Procédures d'extraction .....	60
II.1.2.5.1. Extraction par des solvants organique .....	60

II.1.2.5.2. Extraction des tanins .....	62
II.1.2.6. Détermination de la teneur en métabolites secondaires.....	63
II.1.2.6.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC).....	63
II.1.2.6.2. Dosage des flavonoïdes (TFC) .....	64
II.1.2.6.3. Dosage des tanins hydrolysables .....	64
II.1.2.6.4. Dosage des tanins condensés.....	64
II.1.2.7. Analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse.....	65
II.1.2.7.1. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) .....	65
II.1.2.7.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse	
LCMS/MS	66
II.1.2.8. Analyses statistiques.....	67
II.2. Résultats .....	68
II.2.1. Analyses physico-chimiques de la poudre des feuilles du noyer et de l'olivier .....	68
II.2.2. Etude phytochimique.....	69
II.2.2.1. Screening phytochimique.....	69
II.2.2.2. Dosages spectro-photométriques des métabolites secondaires .....	70
II.2.2.3. Analyses chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse .....	71
II.3. Discussion.....	79
II.4. Conclusion .....	82

### **Chapitre III. Etude mycologique et activité antifongique**

III.1. Matériel et méthodes .....	83
III.1.1. Matériel.....	83
III.1.2. Méthodes .....	83
III.1.2.1. Échantillonnage .....	83
III.1.2.2. Caractérisation physico-chimique du blé tendre stocké.....	86
III.1.2.2.1. Détermination du pourcentage des grains brisés .....	86
III.1.2.2.2. Détermination de la teneur en eau (humidité).....	86
III.1.2.2.3. Détermination de taux de cendres .....	86
III.1.2.2.4. Potentiel d'hydrogène (pH).....	87
III.1.2.3. Caractérisation mycologique du blé tendre stocké.....	88
III.1.2.3.1. Isolement de la flore fongique .....	88
III.1.2.3.2. Identification des isolats .....	89

III.1.2.3.2.1. Identification phénotypique .....	89
III.1.2.3.2.2. Identification moléculaire des souches les plus abondants .....	91
III.1.2.4. Activité antifongique .....	93
III.1.2.4.1. Effet sur la croissance mycélienne .....	93
III.1.2.4.2. Effet des extraits sur la germination des conidies .....	95
III.1.2.5. Analyses statistiques .....	95
III.2. Résultats .....	96
III.2.1. Analyses physico-chimiques du blé tendre stocké.....	96
III.2.1.1. Détermination du pourcentage des grains brisés.....	96
III.2.1.2. Paramètres physico-chimiques.....	97
III.2.2. Etude mycologique .....	97
III.2.2.1. Distribution et abondance relative des champignons isolés .....	97
III.2.2.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des morphotypes au sein des genres <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> .....	99
III.2.2.3. Caractérisation moléculaire des souches d' <i>Aspergillus</i> spp. et de <i>Penicillium</i> ...	102
III.2.3. Activité antifongique.....	104
III.2.3.1. Effet sur la croissance mycélienne .....	104
III.2.3.2. Effet sur la germination.....	115
III.3. Discussion .....	117
III.4. Conclusion.....	122

## **Chapitre IV. Activité insecticide et étude histologique**

IV.1. Matériel et méthodes.....	123
IV.1.1. Matériel .....	123
IV.1.1.1. Origines des insectes et élevage .....	123
IV.1.2. Méthodes .....	124
IV.1.2.1. Test de toxicité.....	124
IV.1.2.1.1. Préparation des insectes.....	124
IV.1.2.1.2. Préparation des concentrations .....	124
IV.1.2.1.3. Application .....	125
IV.1.2.1.4. Expression des résultats.....	125
IV.1.2.2. Analyse statistique .....	126
IV.1.2.3. Etude histologique .....	126

IV.1.2.3.1. Dissection de l'insecte.....	127
IV.1.2.3.2. Réalisation des coupes histologiques .....	127
IV.1.2.3.3. Coloration et montage des coupes .....	128
IV.2. Résultats.....	129
IV.2.1. Évaluation de l'activité insecticide des extraits des feuilles de noyer commun. et d'olivier cultivé sur les adultes de <i>S.oryzae</i> .....	129
IV.2.2. Doses létales .....	133
IV.2.3. Temps létaux .....	134
IV.2.4. Etude histologique .....	135
IV.3. Discussion .....	138
IV.4. Conclusion .....	140
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>141</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>144</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Liste des travaux scientifiques</b>	
<b>Résumé (Français, Arabe, Anglais)</b>	

## *Liste des abréviations*

ATCC	: American type culture collection.
ACJ-O	: Extrait hydro-acétonique des feuilles de noyer ou d'olivier.
ASP	: <i>Aspergillus</i> .
AEJ-O	: Fraction acétate éthyle des feuilles de noyer ou d'olivier.
BTJ-O	: Fraction n-butanol des feuilles de noyer ou d'olivier.
BT	: Blé tendre.
CCLS	: Coopérative des Céréales et Légumes Secs.
CHJ-O	: Fraction chloroformique des feuilles de noyer ou d'olivier.
CGMS-TOF/quadripole	: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse-Time of fly/quadripole.
DDL	: Degré de liberté.
DL	: dose létale.
EPJ-O	: Fraction éther de pétrole des feuilles de noyer ou d'olivier.
FAO	: Food and Agriculture Organisation/Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
F	: Fischer.
IC	: Intervalle de Confiance.
ITS	: Espaceur interne transcrit de l'ADN.
HMJ-O	: Extrait hydro-méthanolique des feuilles de noyer ou d'olivier.
LCMS/MS	: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse.
MCC	: Mortalité Cumulée Corrigée.
MEGA	: Molecular Evolution Genetic Analysis.
MSs	: Métabolites secondaires.
NCBI	: National Center of Biotechnology Information/ Centre américain pour les informations biotechnologiques.
NIST	: National Institute of Sandards and Technology/ Institut national des standards et technologie.
PCR	: Polymérase chain reaction / Amplification en chaîne par polymérase ou réaction de polymérisation en chaine.
PDA	: Pomme de terre Dextrose Agar.

PDB	: Pomme de terre Dextrose Bouillon.
P	: probabilité.
SC	: sommes des carrées.
SM	: sommes des moyennes.
SWA	: soft wheat Agar.
TAL	: <i>Talaromyces</i> .
TNJ-O	: Extrait tannique des feuilles de noyer ou d'olivier.
TL	: Temps létale.
µg EAG/mg E sec.	: Microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec.
µg EC/mg E	: Microgramme équivalent de Catéchine par milligramme d'extrait sec.
µg EAT/mg E sec.	: Microgramme équivalent d'acide tannique par milligramme d'extrait sec.
µg EQ/mg E	: Microgramme équivalent de Quercétine par milligramme d'extrait sec.
v/v	: Volume/Volume.
$\chi^2$	: Khi-deux.



# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Cycle végétatif du blé tendre.....	7
<b>Figure 2.</b> Anatomie du grain de blé tendre.....	9
<b>Figure 3.</b> Rapport de production/ rendement de blé dans le monde entre 1994-2021.....	11
<b>Figure 4.</b> Production, utilisation et stocks de blé.....	12
<b>Figure 5.</b> Bâtiment de stockage en vrac .....	13
<b>Figure 6.</b> Silo métalliques .....	14
<b>Figure 7.</b> Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> .....	17
<b>Figure 8.</b> Caractères du thalle de genre <i>Penicillium</i> .....	18
<b>Figure 9.</b> Schéma d'un pénicille .....	19
<b>Figure 10.</b> Caractères morphologiques des <i>Fusarium</i> .....	20
<b>Figure 11.</b> Appareil reproducteur des mucorales.....	21
Figure 12. Voies de biosynthèse des mycotoxines .....	23
<b>Figure 13.</b> <i>Sitophilus oryzae</i> adulte (Coleoptera : Curculionidae) .....	26
<b>Figure 14.</b> Stades de développement de <i>S. oryzae</i> .....	27
<b>Figure 15.</b> Trou de ponte de <i>Sitophilus oryzae</i> .....	28
<b>Figure 16.</b> Dégâts de <i>S.oryzae</i> sur blé tendre.....	31
<b>Figure 17.</b> Noyer commun ( <i>Juglans regia</i> L.) .....	34
<b>Figure 18.</b> Ecorce de <i>Juglans regia</i> L.....	34
<b>Figure 19.</b> Rameaux de <i>Juglans regia</i> L.....	35
<b>Figure 20.</b> Feuille de <i>Juglans regia</i> L.....	36
<b>Figure 21.</b> Fleurs (chatons mâles et femelles) de <i>Juglans regia</i> L.....	36
<b>Figure 22.</b> Fruit de <i>Juglans regia</i> L.....	37
<b>Figure 23.</b> Arbre d'olivier cultivé .....	32
<b>Figure 24.</b> Feuilles d'olivier cultivé.....	43
<b>Figure 25.</b> Fleurs d'olivier.....	43
<b>Figure 26.</b> Fruits d'olivier .....	44
<b>Figure 27.</b> Feuilles d'oléastre.....	44
<b>Figure 28.</b> Carte oléicole mondiale.....	45
<b>Figure 29.</b> Quatre grands types de métabolites secondaires qui possèdent les principaux terpènes et phénols .....	49

<b>Figure 30.</b> Structure chimique d'isoprene et classification des terpenes en fonction du nombre d'unité d'isoprène .....	50
<b>Figure 31.</b> Principales classes de polyphénols : flavonoïdes, non flavonoïdes (acides phénoliques, lignanes, stilbènes) et les tanins .....	51
<b>Figure 32.</b> Structures chimiques de quelques alcaloïdes végétaux courants .....	52
<b>Figure 33.</b> Localisation géographique des zones de récoltes .....	55
<b>Figure 34.</b> Feuilles d' <i>O.europaea</i> var rougette (A) et <i>J.regia</i> L. (B) après réduction en poudre fine .....	56
<b>Figure 35.</b> Organigramme décrivant le protocole d'extraction des poudres de feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette par les solvants a polarité croissante .....	61
<b>Figure 36.</b> Organigramme décrivant le protocole d'extraction des tanins des poudres de feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette.....	63
<b>Figure 37.</b> Teneurs des extraits de feuilles d'olivier variété rougette en polyphénols totaux(TPC), flavonoïdes totaux(TFC), tanins hydrolysable(HTC) et tanins condensés (CTC) .....	70
<b>Figure 38.</b> Teneurs des extraits de feuilles du noyer commun en polyphénols totaux(TPC), flavonoïdes totaux(TFC), tanins hydrolysable(HTC) et tanins condensés (CTC) .....	70
<b>Figure 39.</b> Localisation géographique des zones de prélèvements de blé tendre stocké .....	84
<b>Figure 40.</b> Valeurs moyennes des données climatiques (température en °C, pluviométrie en mm et altitude en m) des régions durant les années d'échantillonnage 2019 et 2020.....	84
<b>Figure 41.</b> Echantillons du blé tendre stocké .....	85
<b>Figure 42.</b> Incubation des graines de blé tendre entières et concassées sur le milieu PDA pendant 4 à 7 jours.....	88
<b>Figure 43.</b> Prélèvement d'une moisissure à l'aide d'une cellophane adhésive .....	90
<b>Figure 44.</b> Techniques utilisées pour l'évaluation du pouvoir antifongique des extraits de feuilles de Noyer commun et d'Olivier cultivé sur les souches fongiques isolées du blé tendre stocké .....	94
<b>Figure 45.</b> Pourcentage des graines de blé tendre concassé issus de différentes régions .....	96
<b>Figure 46.</b> Fréquences des différents genres fongiques isolés à partir de différents échantillons du blé tendre stocké .....	99
<b>Figure 47.</b> Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques souches d' <i>Aspergillus</i> spp. (GX100): Asp1(A), Asp2(B) et Asp3(C) .....	101

<b>Figure 48.</b> Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques souches de <i>Penicillium</i> spp. (GX100) : Pen 1 et 5 (A), Pen 2 et 4 (B) et Pen 3(C) .....	<b>102</b>
<b>Figure 49.</b> Arbre phylogénique basé sur le Maximum-Likelihood généré à partir de l'analyse des séquences ITS. Cet arbre montre la relation entre les souches 09BT12 (ON796542) et S-48-1(OP542354) avec les souches types des espèces appartenant au genre <i>Aspergillus</i> .....	<b>103</b>
<b>Figure 50.</b> Arbre phylogénique basé sur le Maximum-Likelihood généré à partir de l'analyse des séquences $\beta$ -tubuline. Cet arbre montre la relation entre les souches <i>T.funiculosus</i> TAL48-10 (OR193001) et <i>P.chrysogenum</i> PEN48-10 (OR193002) avec les souches types des espèces appartenant au genre <i>Talaromyces</i> .....	<b>104</b>
<b>Figure 51.</b> Effet de l'extrait tannique des feuilles de <i>J.regia</i> L. et des feuilles de <i>O.europaea</i> var rougette sur la croissance mycélienne des isolats d' <i>Aspergillus</i> spp. (Original) .....	<b>105</b>
<b>Figure 52.</b> Effet de l'extrait tannique des feuilles de <i>J.regia</i> L. et des feuilles d' <i>O.europaea</i> var rougette sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Penicillium</i> spp. (Original).....	<b>109</b>
<b>Figure 53.</b> Aspect microscopique des isolats fongiques du genre <i>Aspergillus</i> après expositions aux extraits tanniques des feuilles de noyer et d'olivier cultivé (TNO et TNJ).....	<b>113</b>
<b>Figure 54.</b> Aspect microscopique de certains isolats fongiques du genre <i>Penicillium</i> après expositions aux extraits tanniques des feuilles de noyer et d'olivier cultivé (TNO et TNJ) ..	<b>114</b>
<b>Figure 55.</b> Pourcentage d'inhibition de la germination des spores des isolats d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> par les deux extraits tanniques (TNO et TNJ) .....	<b>115</b>
<b>Figure 56.</b> Action des extraits TNO et TNJ sur la germination des conidies de l'isolat d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> en comparaison avec les témoins après 24h d'incubation (GX40).....	<b>116</b>
<b>Figure 57.</b> Dispositif d'élevage des charançons du riz <i>S.oryzae</i> .....	<b>124</b>
<b>Figure 58.</b> Schéma du protocole expérimental suivi lors de l'évaluation de l'activité insecticide des extraits de feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette .....	<b>125</b>
<b>Figure 59.</b> Évolution des taux de mortalité moyennes corrigées cumulées ( $\pm$ ES) des adultes du <i>S.oryzae</i> après traitement avec les extraits brutes et fractions flavonoïques et tanniques de <i>J.regia</i> L. à la concentration 625 $\mu$ g/mL, 315 $\mu$ g/mL, 75 $\mu$ g/mL. Les valeurs portant différentes lettres étaient significativement différentes sur la base de $P \leq 0,05$ . .....	<b>129</b>
<b>Figure 60.</b> Évolution des taux de mortalité moyennes corrigées cumulées ( $\pm$ ES) des adultes du <i>S.oryzae</i> après traitement avec les extraits brutes et fractions flavonoïques et tanniques de <i>O.europaea</i> var rougette à la concentration 625 $\mu$ g/mL, 315 $\mu$ g/mL, 75 $\mu$ g/mL. Les valeurs portant différentes lettres étaient significativement différentes sur la base de $P \leq 0,05$	<b>132</b>

**Figure 61.** Aspect externe des différentes parties du corps chez les adultes de *S.oryzae* non traités (A) et traités (B) observées à la loupe (X40)..... **133**

**Figure 62.** Photomicrographie d'une coupe longitudinale montrant la structure de l'abdomen d'un adulte de *S.oryzae* , témoin (A<sub>1</sub>), traité avec les CL<sub>50</sub> des fractions : EPJ (A<sub>2</sub>), BTJ (A<sub>3</sub>), EPO(A<sub>4</sub>) et AEO (A<sub>5</sub>) après 4 jours de traitement (G × 100)..... **136**

**Figure 63.** Photomicrographie d'une coupe longitudinale montrant la structure de la tête d'un adulte de *S.oryzae* , témoin (T<sub>1</sub>), traité avec les CL<sub>50</sub> des fractions : EPJ (T<sub>2</sub>), BTJ (T<sub>3</sub>), EPO(T<sub>4</sub>) et AEO (T<sub>5</sub>) après 4 jours de traitement (G × 100)..... **137**

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Classification des espèces du genre <i>Triticum</i> .....	7
<b>Tableau 2.</b> Composition chimique des différentes parties de <i>J.regia</i> .....	39
<b>Tableau 3.</b> Composition chimique des différents organes d' <i>O.europaea</i> L.....	47
<b>Tableau 4.</b> Données géographiques et bioclimatiques des zones de récolte de feuilles de noyer et d'olivier .....	55
<b>Tableau 5.</b> Différents tests du screening phytochimique .....	59
<b>Tableau 6.</b> Rendements des extractions de la poudre des feuilles de deux plantes par les solvants organiques de polarité croissante .....	60
<b>Tableau 7.</b> Rendements des extraits par les solvants organiques de la poudre des feuilles de deux plantes olivier et noyer .....	62
<b>Tableau 8.</b> Mode gradient des phases mobiles pour l'analyse LCMS/MS .....	67
<b>Tableau 9.</b> Résultats des paramètres physico-chimiques de la poudre des feuilles des deux plants <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette .....	68
<b>Tableau 10.</b> Tests phytochimiques des feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette .....	69
<b>Tableau 11.</b> Résultats des composés chimiques des extraits éthériques des feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O. europaea</i> var rougette identifiés par CGMS-TOF.....	73
<b>Tableau 12.</b> Résultats des composés chimiques des fractions chloroformiques des feuilles de <i>J.regia</i> et <i>O. europaea</i> var rougette identifiés par CGMS-TOF .....	74
<b>Tableau 13.</b> Résultats des composés chimiques de l'extrait tannique des feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette identifiés par CGMS-Quadrirole .....	75
<b>Tableau 14.</b> Résultats des composés chimiques de la fraction acétate éthyliques des feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette identifiés par LCMS/MS .....	77
<b>Tableau 15.</b> Résultats des composés chimiques de la fraction n-butanolique des feuilles de <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette identifiés par LCMS/MS .....	78
<b>Tableau 16.</b> Données sur les échantillons collectés et les conditions lors du stockage.....	85
<b>Tableau 17.</b> Taux d'humidité relative, pH et cendres des échantillons de blé tendre .....	97

<b>Tableau 18.</b> Isolats fongiques isolés des échantillons de blé tendre stocké.....	<b>98</b>
<b>Tableau 19.</b> Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de <i>J.regia</i> L. sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre <i>Aspergillus</i> : comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test) .....	<b>107</b>
<b>Tableau 20.</b> Evaluation de l'effet des extraits de feuilles <i>O.europaea</i> var rougette sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre <i>Aspergillus</i> : comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test) .....	<b>108</b>
<b>Tableau 21.</b> Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de <i>J.regia</i> L. sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre <i>Penicillium</i> : comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test) .....	<b>111</b>
<b>Tableau 22.</b> Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de <i>O.europaea</i> var rougette sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA ( $W_a=0.98\pm 0.02$ ) vis-à-vis les isolats du genre <i>Penicillium</i> : comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test) .....	<b>112</b>
<b>Tableau 23.</b> Doses létales, estimées par une analyse de probabilité Probit, des extraits de feuilles de deux plantes <i>J.regia</i> L. et <i>O.europaea</i> var rougette nécessaires pour tuer 50 et 90% des adultes du charançon du riz après 4 jours de traitement .....	<b>134</b>
<b>Tableau 24.</b> Temps létaux, estimés par une analyse de probabilité Probit, des extraits des deux plantes <i>J.regia</i> L. <i>O.europaea</i> var rougette nécessaires pour tuer 50 et 90% des adultes de <i>S. oryzae</i> soumis à une concentration de 625 µg/mL .....	<b>135</b>

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Le blé tendre, *Triticum aestivum* (Linn.), est une céréale économiquement importante symbolisant le principal aliment de base de la population mondiale (**Giraldo et al., 2019; Singh et al., 2023**). En 2022, le rendement mondial du blé a atteint plus de 700 millions de tonnes, consolidant ainsi sa position de deuxième culture céréalière la plus produite, après le maïs (**FAO, 2022**). Chaque année, on estime que 25 à 30 % des récoltes sont perdues en raison des dommages causés par divers insectes nuisibles ou de champignons. Ces ravageurs menacent les cultures à la fois dans les champs et pendant le stockage, entraînant d'importantes pertes de céréales alimentaires de valeur après la récolte (**FAO, 2022**).

Les pertes les plus importantes sont infligées par différentes espèces de coléoptères, de lépidoptères et d'acariens ou carrément des champignons (**Ahmed et al., 2022**). Parmi les coléoptères, le charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L.) (Coleoptera : Curculionidae) est largement reconnu comme l'un des ravageurs les plus dévastateurs des céréales stockées (**Jagadeesan et al., 2012**). Les infestations d'insectes peuvent altérer l'atmosphère de la chambre de stockage, créant des circonstances idéales pour les champignons de stockage envahissants qui causent des pertes supplémentaires (**Philips et Throne, 2010**).

Parmi ces champignons, des souches appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Cladosporium* se distinguent par leur impact significatif sur la détérioration des produits céréaliers stockés et la production de mycotoxines (**Lahouar et al., 2018**). De nombreuses espèces couramment présentes dans les aliments sont xérophiles, et les principaux producteurs de toxines peuvent se développer à une activité de l'eau de plus de  $0,80 \pm 0,10$  (**Cabañes et Bragulat, 2018**). Le facteur critique influençant la contamination des aliments par des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* toxinogènes réside dans le fait que l'infection se produit avant la récolte ou ultérieurement pendant le séchage et le stockage. Les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* peuvent contaminer les aliments au cours de ces processus. L'accumulation de toxines peut résulter d'un séchage lent ou de conditions de stockage inadéquates, entraînant des pertes économiques importantes et des problèmes de santé publique majeurs (**Taniwat, 2018**).

Les techniques agricoles traditionnelles consistent à ajouter des produits locaux tels que des minéraux, des huiles, des feuilles ou des extraits de plantes aux grains stockés afin de les protéger contre les infestations multiples (**Hamza et al., 2016**). Bien que les méthodes de protection des plantes aient une longue histoire et aient été efficaces dans plusieurs pays africains, elles ont été largement abandonnées au profit d'approches modernes en raison des



## INTRODUCTION GENERALE

changements intervenus dans l'agriculture au cours des dernières décennies (**Kalogiannidis et al., 2022**). Les fumigants synthétiques sont largement et uniquement utilisés dans de nombreux pays en développement pour détruire avec succès tous les stades de développement des insectes nuisibles dans les installations de stockage ou également vis-à-vis des champignons de stocks (**Fields et White, 2002 ; Rajashekar et al., 2012**). Le bromure de méthyle et la phosphine étaient les fumigants chimiques les plus souvent utilisés pour prévenir les ravageurs des céréales stockées dans le monde entier. Cependant, il a été démontré que le bromure de méthyle était nocif pour la couche d'ozone stratosphérique depuis 1993, chose pour laquelle, il a été progressivement éliminé conformément au protocole de Montréal (**Norman, 2005**). Cette action a provoqué un changement de paradigme dans l'échelle d'utilisation de la phosphine, non seulement en termes de quantité, mais aussi dans son utilisation pour toute une série d'articles stockés autres que les céréales alimentaires, tels que les épices, les fèves de cacao, les fruits secs, les noix et même les fruits frais (**Horn et al., 2005**).

Cependant, l'acceptation et l'utilisation des pesticides synthétiques ont été entachées d'un certain nombre de défauts, notamment la toxicité pour les êtres vivants, l'appauvrissement de la couche d'ozone, la toxicité pour les espèces non ciblées, l'adultération des produits, l'approvisionnement imprévisible et l'indisponibilité pendant les saisons importantes (**Horn et al., 2005**). L'utilisation continue de ces insecticides et/ou fongicides entraîne le développement de la résistance chez les ravageurs ciblés (**Graham-Bryce, 1977 ; Primental et al., 2007**).

En outre, le coût des pesticides pèse parfois sur la situation financière des pays. Il est donc crucial de trouver une stratégie de remplacement qui permette de réduire efficacement l'utilisation des produits chimiques. Les molécules organiques végétales sont depuis longtemps considérées comme des alternatives aux pesticides chimiques fabriqués par l'homme pour la lutte contre les bioagresseurs des céréales (**Singh et al., 2021**).

En conséquence, la recherche scientifique s'est focalisée sur le développement d'une nouvelle génération de pesticides naturels, y compris des produits à base de plantes ou d'extraits ayant des propriétés phytosanitaires (**Pathak et al., 2022**). Les produits végétaux dotés d'une puissante activité insecticide et fongicide pourraient être utilisés pour lutter contre les coléoptères entreposés ainsi que les champignons de stocks. Les plantes sont connues pour produire divers composés phénoliques secondaires qui jouent un rôle majeur dans la réduction des populations d'insectes et des champignons inféodés aux grains stockés (**Rajashekar et al., 2010 ; Rajashekar et al., 2013, Lahouar et al., 2018**). Plusieurs plantes ont été étudiées pour

## INTRODUCTION GENERALE

leurs propriétés insecticides et fongicides, telles que : *Lantana camara* Linn. (Verbenaceae), *Tagetes filifolia* (Lag.)(Asteraceae), *Mentha pelegium* Linn. (Lamiaceae) , *Feoniculum vulgare* (Mill. )(Apiaceae) , *Nerium oleander* (Apocynaceae), *Pimenta racemose*, *Eucalyptus saligna* (Sm.)(Myrtaceae) et *Juniperus foetidissima* (Willd.)(Cupressaceae) (**Rajashekar et al., 2012 ; Green et al., 2015 ;Zaid et al., 2022**).

Parmi les plantes médicinales connues pour leur abondance en composés phénoliques biologiquement actifs, le noyer commun qui se distingue par ses feuilles, son écorce, son brou et ses fleurs mâles, et l'olivier cultivé qui se différencie principalement par ses feuilles et ses fruits. Ces deux plantes représentent une riche source de composés antimicrobiens et entomocide (**Fernández-Agulló et al., 2013 ; Rather et al., 2012 ; Martinez Navarro et al. 2021 Martinez-Zamora et al. 2021 ; Chamorro et al., 2022 ;**).

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail de thèse, conduit au sein du laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques dont le principal objectif est de mettre l'accent sur les potentialités antifongiques et insecticides d'une gamme d'extraits de feuilles de *Juglans regia* L. et *Olea europaea* var rougette vis-à-vis des champignons filamenteux et le charançon du riz *Sitophilus oryzae* principaux bio-agresseurs du blé stocké.

Pour atteindre notre objectif, plusieurs aspects ont été traités :

- Le premier aspect concerne la valorisation des feuilles de deux plantes arboricoles fruitières : noyer commun et olivier cultivé, par une étude phytochimique détaillée.
- Le deuxième aspect aborde en premier lieu l'isolement et l'identification des champignons filamenteux mésophiles à partir des échantillons du blé tendre stocké et en deuxième lieu l'étude de l'activité antifongique des extraits de feuilles de noyer et d'olivier à l'égard des souches fongiques isolées les plus abondantes.
- Le troisième aspect est consacré à la mise en évidence de l'activité insecticide des extraits de feuilles de noyer commun et d'olivier cultivé sur un insecte des denrées stockées : le charançon du riz (*S.oryzae*). Les effets différés des fractions foliaires et l'étude de leurs effets à l'échelle cellulaire et tissulaire chez l'insecte ont également sanctionné cet aspect.

**CHAPITRE I.**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I.1. Caractéristiques générales du blé tendre

### I.1.1. Historique

Le terme "céréale" trouve son origine dans "Ceres", le nom de la déesse préromaine de la récolte et de l'agriculture. Les céréales sont définies comme des grains ou des graines comestibles appartenant à la famille des herbes, les Graminées (McKevith, 2004).

L'histoire du blé est étroitement liée à celle de l'humanité et de l'agriculture. Sa culture remonte à plus de 9000 ans, précédant l'histoire en marquant les débuts de l'agriculture néolithique. Une révolution majeure a été l'apparition de plantes dont les épis et les grains demeuraient attachés, facilitant ainsi leur récolte et leur culture. La chance de l'humanité réside dans le fait que ces graines sont comestibles, riches en énergie, et faciles à conserver et à transporter (Feillet, 2000).

Le blé tendre se distingue par son goût agréable, sa longue durée de conservation, et ses caractéristiques uniques qui en font un ingrédient très attrayant parmi les céréales. Les produits dérivés du blé tendre, tels que les pâtes, les nouilles, et surtout le pain, sont particulièrement appréciés pour leurs caractères organoleptiques et nutritionnels (Nelson, 1985).

### I.1.2. Origine géographique

Le blé a ses origines dans la vallée de la Somalie ainsi que dans les plaines de la Mésopotamie, le long des rivières Tigre et Euphrate, dans une région connue sous le nom de Croissant Fertile (Smith et Wayne, 1995). La domestication du blé a été réalisée à travers un processus qui impliquait le semis de graines issues de graminées sauvages, suivi de cultures et de récoltes successives. Ce processus de sélection a favorisé les formes mutantes présentant des épis robustes qui demeuraient intacts lors de la récolte, une augmentation du nombre de grains par épi, et une tendance des épillets à rester attachés à la tige jusqu'à la récolte. Cela a marqué le début de l'agriculture moderne (Dubcovsky *et al.*, 1997).

Le blé tendre, ou *Triticum aestivum* L., a évolué dans des régions bien éloignées du Croissant Fertile, plus précisément de l'Arménie à la Transcaucasie, couvrant les zones côtières du sud-ouest de la mer Caspienne en Iran (Duvorak *et al.*, 1998). Il englobe diverses sous-espèces et taxons qui, bien qu'ils diffèrent les uns des autres par un ou plusieurs gènes majeurs, restent inter-fertiles (McKey, 1966).

### I.1.3. Origine génétique

Le blé appartient à la tribu Triticeae, qui fait partie de la famille des Poaceae. Cette tribu comprend cinq genres : *Aegilops*, *Elymus*, *Hordeum*, *Secale* et *Triticum*. Les deux derniers, *Triticum* et *Secale*, forment la sous-tribu Triticineae (**Waines et Barnhart, 1992**)(**Tableau 1**).

Toutes les espèces de *Triticum* sont composées de quatre génomes de base notés A, B, D et G. Le nombre de chromosomes de base dans le genre *Triticum* et ses espèces apparentées est de  $x=7$  (**Haider, 2012**). Sur le plan génétique, les espèces sauvages sont diploïdes ( $2n=2x=14$ ), ce qui signifie qu'elles possèdent deux ensembles complets de chromosomes, comme les génomes AA (*Triticum monococcum*) ou DD (*Triticum tauschii*). D'autres espèces sont tétraploïdes ( $2n=4x=28$ ), portant deux génomes, comme les génomes AABB (*Triticum turgidum*) ou AAGG (*Triticum timopheevi*) (**Waines et Barnhart, 1992**).

Selon **Nevo et al. (2002)**, l'hybridation entre les genres de *Triticeae* a donné naissance à des polyploïdes. Un exemple notable est le *Triticum aestivum*, le blé commun ou blé à pain, qui est aujourd'hui la céréale la plus largement cultivée dans le monde. Il est désigné par la formule AABBDD ( $2n=6x=42$ ), résultant de trois génomes homologues, A, B et D, chacun apportant sept paires de chromosomes au génome total de cette espèce (**Haider, 2012**).

Selon **Van Slageren (1994)**, le *Triticum aestivum* aurait émergé suite à des événements rares et indépendants d'hybridation entre une espèce sauvage tétraploïde ( $2n=4x=28$ , AABB) et une espèce diploïde ( $2n=2x=14$ , DD) du genre *Aegilops* L., étroitement liée au *Triticum*. Cette hybridation aurait donné naissance à un triploïde initial stérile (ABD). Un doublement ultérieur des chromosomes aurait conduit à la formation de l'hexaploïde (**Kihara, 1944 ; McFadden et Sears, 1944**), ce qui a représenté pendant des décennies un exemple majeur de l'évolution des espèces cultivées par polyploïdie (**Peterson, 2006**).

Tableau 1. Classification des espèces du genre *Triticum* (Mac Key, 1968)

<b>ESPECES DIPLOIDES</b>		
<b>Génome AA</b>		
<i>T. urartu</i> Tum.		Sauvage
<i>T. monococcum</i> L.	subsp. <i>boeoticum</i> BOISS. subsp. <i>monococcum</i> L.	Sauvage Cultivée.
<b>ESPECES TETRAPLOIDES</b>		
<b>Génome AABB</b>		
<i>T. turgidum</i> ( L. ) Thell.	subsp. <i>dicoccoides</i> ( Korn. ) subsp. <i>dicoccum</i> ( Schrank ) subsp. <i>paleocolchicum</i> ( Men. ) subsp. <i>carthlicum</i> ( Nevski ) conv. <i>turgidum</i> L. conv. <i>durum</i> ( Desf. ) conv. <i>turanicum</i> ( Jakubs ) conv. <i>polonicum</i> L. conv. <i>aethiopicum</i> ( Jakubz. )	Sauvage Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée
<b>Génome AAGG ou AAB' B'</b>		
<i>T. timopheevi</i> Zhuk.	subsp. <i>araraticum</i> ( Jakubz. ) subsp. <i>timopheevi</i> Zhuk.	Sauvage Cultivée
<b>ESPECES HEXAPLOIDES</b>		
<b>Génome AAAABB</b>		
<i>T. zhukowskyi</i> Men. et Et		Cultivée
<b>Génome AA BB DD</b>		
<i>T. aestivum</i> L.	subsp. <i>compactum</i> ( Host. ) subsp. <i>macha</i> ( Dek. et Men ) subsp. <i>spelta</i> ( L. ) Thell. subsp. <i>sphaerococcum</i> ( Perc ) subsp. <i>vavilovi</i> ( Tum. ) sears subsp. <i>vulgare</i> ( Vill. ) Mk.	Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée Cultivée.

#### I.1.4. Cycle végétatif

Le cycle de croissance du blé tendre est divisé en deux périodes distinctes, marquées par des stades de référence. La première période, appelée la phase végétative, s'étend de la germination à l'ébauche de l'épi. Pendant cette phase, la plante se concentre sur la croissance des feuilles et des racines. La seconde période, connue sous le nom de période de reproduction, commence à l'ébauche de l'épi et se poursuit jusqu'à la maturation du grain. Pendant cette phase, la plante développe l'épi et produit les grains (Soltner, 2012). Différentes échelles de notation des stades de référence du blé ont été établies, avec celle de Zadocks *et al.* (1974) est la plus adoptée (Fig.1).

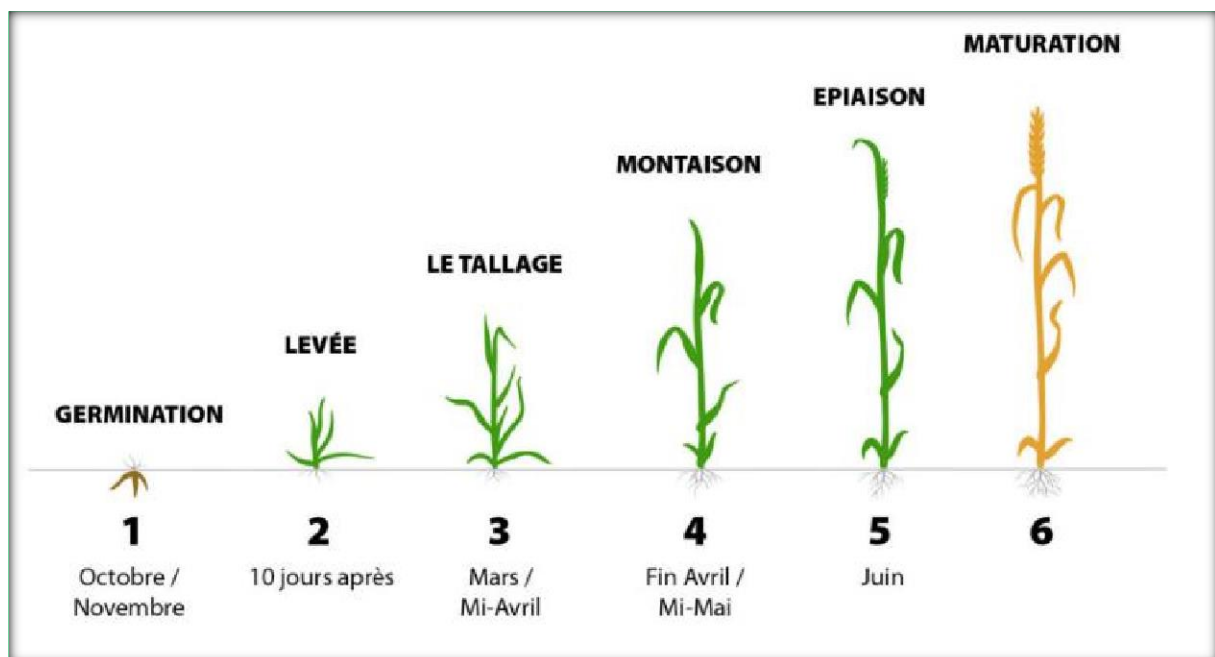


Figure 1. Cycle végétatif du blé tendre (Soltner, 2012).

#### I.1.5. Classification botanique

Le blé, selon la classification de certains chercheurs, est regroupé dans le genre *Triticum*, qui appartient à la tribu des Triticées. Il fait partie de la sous-famille des Pooideae, qui elle-même est une branche de la grande famille des Poacées. Plus largement, ces plantes font partie du groupe des angiospermes monocotylédones. La famille des Poacées est vaste, comprenant plus de 600 genres et plus de 10 000 espèces qui poussent dans des environnements variés en termes de latitude et de climat (Kellogg, 2001).

La classification botanique de cette plante selon **Feillet.(2000)** est comme suit :

- **Règne** : Plantae.
- **Division** : Angiospermes.
- **Classe** : Liliopsida (Monocotylédons).
- **Ordre** : Poale.
- **Famille** : Gramineae.
- **Sous-famille** : Festucoideae.
- **Tribu** : Triticeae.
- **Sous-Tribu** : Triticineae.
- **Genre** : *Triticum*.
- **Genre-espèce** : *Triticum aestivum* L. sub *sp aestivum*.

### **I.1.6. Structure et composition**

#### **I.1.6.1. Structure de la graine**

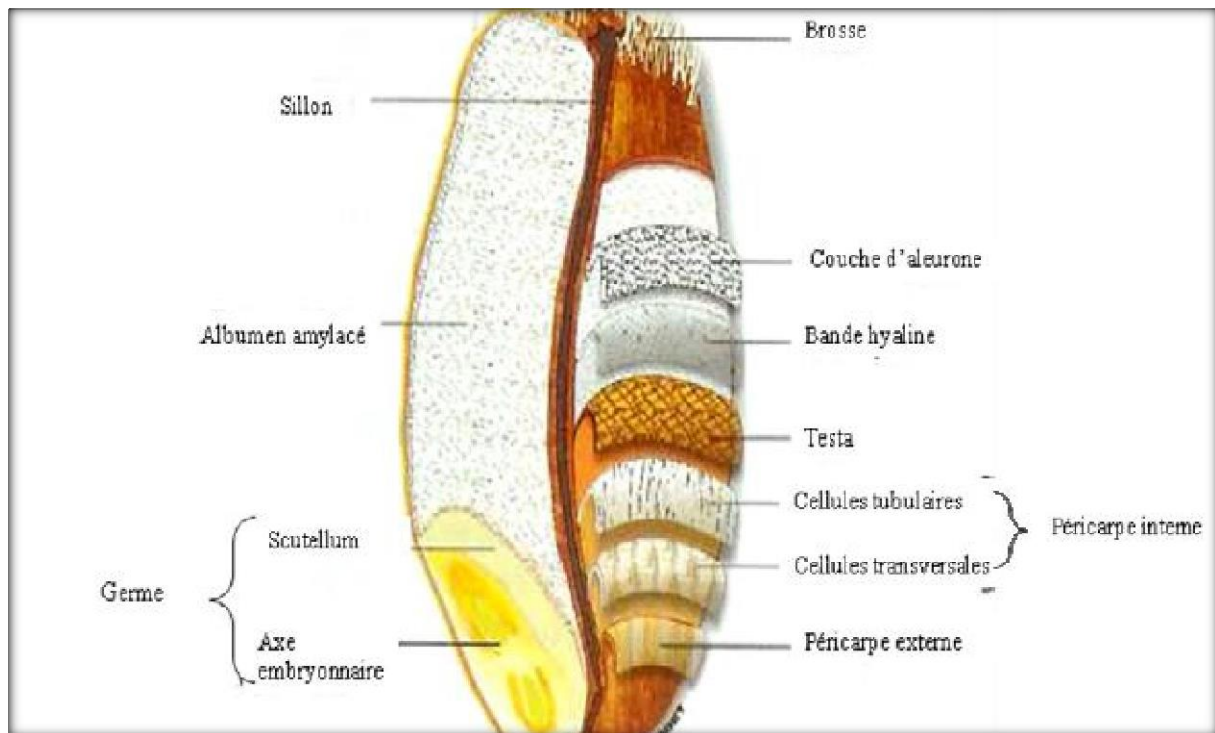
La structure du grain de blé se divise en trois composantes majeures : Les enveloppes qui représentent 13 à 15% du poids, l'amande, ou albumen amylicé (82% à 85% du poids) et le germe, qui représente environ 3% (**Pomeranz, 1988**).

Les enveloppes sont constituées par un péricarpe (4%) lui-même est formé par 3 enveloppes : épicarpe, mésocarpe, endocarpe, un tégument séminal (2%) et une assise protéique (7 à 9%).

Les enveloppes présentent à la fois une membrane souple et dure à briser (**Pomeranz, 1988**).

L'amande ou albumen amylicé représente les substances de réserve pour la germination de du grain (**Khalid et al., 2023**)(Fig.2).





**Figure 2.** Anatomie du grain de blé tendre (Surget et Barron, 2005).

### I.1.6.2. Composition de la graine de blé

Le grain de blé est principalement constitué d'amidon, qui représente environ 70% de la matière sèche du grain et est situé dans l'albumen. Les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et sont présentes dans tous les tissus du grain de blé, avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (Pomeranz, 1988, Surget et Barron, 2005, Iqbal *et al.*, 2020). Les pentosanes, des polysaccharides non amylicés, représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et constituent les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80%). Les grains de blé sont également une bonne source de minéraux environ 3-8%, notamment de magnésium ainsi que des vitamines (B, E et K) et des enzymes (superoxyde dismutase, protéase, amylase, lipase, transhydrogénase, cytochrome oxydase) (Wieser *et al.*, 2020).

De plus, ils contiennent plusieurs molécules présentant des activités intéressantes comme les composés antioxydants tels que les acides phénoliques et les caroténoïdes, ainsi que les lignanes (Slavin *et al.*, 1999 ; Hu *et al.*, 2021).

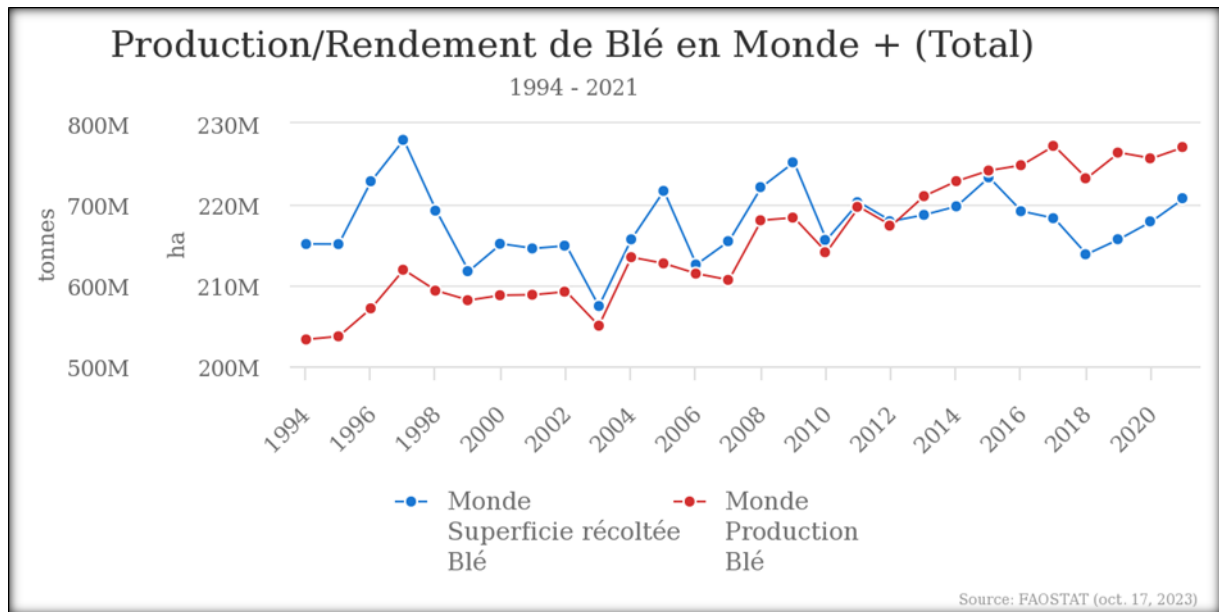
### I.1.7. Production

#### I.1.7.1. Dans le monde

Le blé occupe une place de premier plan parmi les cultures vivrières dans le monde. Il se positionne en troisième rang dans la production céréalière mondiale, devancé seulement par le maïs (*Zea mays* L.) et le riz (*Oryza sativa* L.), mais il domine en termes de superficie cultivée (FAO, 2019).

Le blé constitue une culture vivrière cruciale pour plus d'un tiers de la population mondiale et, à l'instar du riz, il est la céréale la plus consommée, contribuant à hauteur de 20 % des apports caloriques dans leur alimentation. Chaves *et al.* (2013) ont indiqué que 85 % de la population mondiale dépendent du blé pour les besoins de base en calories, tandis que 82 % comptent sur cette denrée pour les apports protéiques. À l'échelle mondiale, en 2020, la production de blé a atteint 754 millions de tonnes, avec une superficie de 220 millions d'hectares, fournissant ainsi de la nourriture à plus d'un milliard de personnes dans les pays en développement (FAO, 2021) (Fig.3).

En termes de volume de production du blé tendre, l'Union Européenne est en tête avec 155 millions de tonnes, suivie respectivement par la Chine (126 millions de tonnes), l'Inde (95 millions de tonnes), la Russie (59 millions de tonnes), les États-Unis (55 millions de tonnes), le Canada (29 millions de tonnes), l'Australie (26 millions de tonnes), l'Ukraine (24 millions de tonnes) et l'Argentine (12 millions de tonnes) (Siad *et al.*, 2017). Les principaux pays exportateurs de blé sont les États-Unis, le Canada, l'Australie, l'Union européenne, la Russie, l'Ukraine et l'Argentine (USDA, 2014).

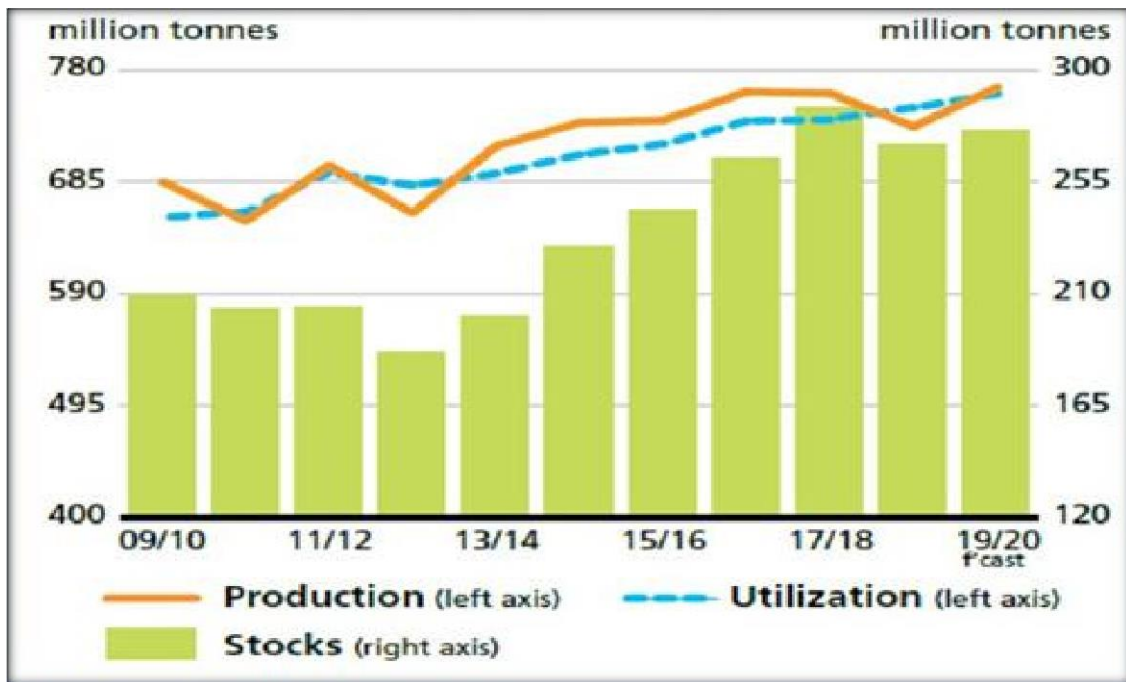


**Figure 3.** Rapport de production/ rendement de blé dans le monde entre 1994-2021 (FAO, 2021).

### I.1.7.2. En Algérie

Le secteur des céréales joue un rôle fondamental dans l'agriculture Algérienne, avec une production céréalière atteignant 3,3 millions de tonnes en 2014 (FAO, 2015). Les céréales constituent l'essentiel de l'alimentation quotidienne de la population et occupent une superficie de 2,7 millions d'hectares, représentant ainsi près de 40 % de la superficie agricole totale du pays (Tirichine *et al.*, 2015).

Les cultures céréalières principales sont le blé et l'orge (*Hordeum* sp.), occupant respectivement 22 % et 14 % des terres arables en 1994. Le blé dur est la céréale dominante, occupant 45 % de la superficie consacrée aux céréales, soit 1,6 million d'hectares (Kirouani *et al.*, 2019). Le blé tendre se classe en troisième position après le blé dur et l'orge, avec une superficie annuelle cultivée de 0,8 million d'hectares, équivalant à 24,2 % de la superficie consacrée aux céréales (Mebdoua et Ounane, 2019). Cette production a connu des fluctuations variables d'une année à une autre avec un maximum enregistré pour l'an 2020 (Fig.4).



**Figure 4.** Production, utilisation et stocks de blé (CIC, 2019).

L'Algérie est l'un des plus grands importateurs mondiaux de céréales. Les pics d'importations ont atteints les 7,4 millions de tonnes en 2011 et 6,9 millions de tonnes en 2012 (**Touchan et al., 2016**). Malgré l'augmentation de la production, l'Algérie continue d'importer 75 % de ses besoins en céréales. La France est le principal exportateur de blé dur vers l'Algérie, tandis que le Canada est le principal fournisseur de blé tendre (**FAO, 2021**). Pour l'an 2023, l'Algérie a acquis un volume du blé de 800 000 tonnes par le biais d'un appel d'offres international (**Bekkis, 2023**)

### **I.1.8. Méthodes et modes de stockage**

#### **I.1.8.1. Stockage**

Le stockage est le processus visant à conserver les céréales pendant une période déterminée, en les entreposant conformément à des normes qui garantissent leur préservation optimale (**Laurent et al., 2003**).

Les céréales sont récoltées une fois par an, mais leur utilisation s'étale sur toute l'année. Par conséquent, il est nécessaire de les conserver, que ce soit à la ferme (pour la production nationale) ou dans des installations spécialisées (pour la production nationale et les importations). L'objectif d'un bon stockage et d'une conservation adéquate est de préserver au maximum les caractéristiques initiales des grains (**Ndiaye, 1999**).

### I.1.8.2. Modes de stockage

#### I.1.8.2.1. Stockage dans des silos souterrains (Matmoura)

Ce type de stockage est fréquemment pratiqué en utilisant des structures telles que des trous cylindriques ou rectangulaires creusés dans le sol. Cependant, il est essentiel que le sol soit stable, ce qui est courant dans les régions sèches, notamment les zones argileuses. Ces installations de stockage sont généralement situées à proximité des fermes. Leur capacité de stockage peut varier considérablement, allant de dix mètres cubes (**Doumaindji *et al.*, 2003**). Ce mode de stockage est facile à construire et présente des avantages tels qu'une isolation thermique efficace, une protection contre les rongeurs, une réduction de l'activité des insectes, et une barrière contre les infestations (**Aidani, 2015**).

Ce type de stockage présente également des inconvénients, notamment la difficulté à vider la fosse, les dégâts dus à l'humidité s'infiltrant par le sol, ainsi que la condensation d'eau à la partie supérieure. Ces conditions favorisent le développement de moisissures et les processus de fermentation bactérienne (**Shejbal et Baislambert, 1982**).

#### I.1.8.2.2. Stockage en vrac

Le stockage en vrac implique de laisser les grains en tas dans des hangars ouverts à charpente métallique en plein air (**Fig.5**). Ce mode de stockage comporte des risques de contamination par des moisissures et des bactéries, et sa durée de conservation est relativement courte (**Lasseran et Monroco, 1988 ; Lakhial, 2018**).



**Figure 5.** Bâtiment de stockage en vrac.

### I.1.8.2.3. Stockage en sac

Les grains sont placés dans des sacs en toile de jute ou en polypropylène, puis entreposés dans divers endroits tels que des locaux, des entrepôts ou des hangars. Cette méthode est utilisée lorsque les espaces de grande capacité sont saturés (**Lasseran et Monroco, 1988 ; Lakhial, 2018**).

### I.1.8.2.4. Stockage en silo métallique

Les silos sont des structures cylindriques (**Fig.6**) avec des cellules de diamètres variant de 2 à 4 mètres et des hauteurs allant jusqu'à 20 mètres. Ces structures sont construites en métal, généralement en acier galvanisé ou en aluminium, et peuvent être de type plan ou pendulaire, avec des assemblages boulonnés ou sertis. La partie supérieure des silos est fermée par un plancher sur lequel sont installés les dispositifs de remplissage des cellules. L'utilisation de silos permet de réduire la main-d'œuvre nécessaire, d'augmenter la capacité de stockage et de se passer des sacs coûteux. Ce mode de stockage est couramment employé pour entreposer des céréales après leur broyage (**Bartali et Lamzouri, 1990 ; Lakhial, 2018**).



**Figure 6.** Silo métalliques.



## **I.2. Mycoflore du blé stocké**

### **I.2.1. Généralités**

Les moisissures sont des champignons microscopiques qui se caractérisent par leur structure en filaments appelée mycélium (Guiraud, 2003; Guiraud et Rosec, 2004). Ce sont des organismes pluricellulaires dont le thalle, l'appareil végétatif, est constitué de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés, connus sous le nom d'hyphes. Lorsque la croissance atteint un stade avancé, l'ensemble des hyphes forme un mycélium visible à l'œil nu, ressemblant à une sorte de feutrage à la surface qu'ils colonisent (Nicklin *et al.*, 2000). Les moisissures se reproduisent et se disséminent en produisant des spores, que ce soit par voie sexuelle ou végétative (Guiraud, 2003; Guiraud et Rosec., 2004).

Ces champignons ne peuvent se développer que sur des substrats d'origine organique. Leur structure filamenteuse les rend particulièrement adaptés à coloniser des substrats solides. En raison de leurs caractéristiques écologiques et physiologiques, les moisissures sont les micro-organismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon, 1982).

Il est important de noter que les moisissures contaminent généralement les plantes pendant leur croissance, et la croissance du champignon ainsi que la production de toxines peuvent se poursuivre après la récolte (Pfhof-Leszkowics, 2009).

### **I.2.2. Mycoflore du champ**

La flore présente dans les champs contamine les grains de blé (Deàk, 2008). Les spores de champignons du champ pénètrent les grains et continuent à se développer dans le champ ou attendent d'être récoltées lors de la moisson (Dendy *et al.*, 2000). Certains sols sont déjà contaminés à la base (Reboux, 2006). La contamination des plantes est influencée par divers facteurs, notamment les attaques d'insectes et de leurs larves, qui peuvent créer des lésions dans l'enveloppe des graines, facilitant ainsi la pénétration de l'inoculum à l'intérieur des graines (Portelli, 1999).

D'autres facteurs liés au climat peuvent également favoriser la contamination par ces moisissures et la production de mycotoxines, notamment les insuffisances ou les excès de pluies pendant les phases cruciales du développement des plantes (Proctor, 1995). Les conditions de récolte et les pratiques agricoles ont également une influence significative sur le degré de colonisation des végétaux (Reboux, 2006).

Dans le champ, les grains sont principalement contaminés par des moisissures qui ont besoin de niveaux d'humidité élevés pour se développer (Proctor, 1995). La flore des champs

comprend des espèces potentiellement parasites, telles que les genres *Fusarium*, *Epicoccum*, *Botrytis*, etc. (Multon, 1982).

### I.2.3. Mycoflore intermédiaire

Elle constitue une catégorie comportant une diversité de micro-organismes filamenteux, capables de se développer de manière limitée, en début de stockage et dans des conditions particulières, notamment sur des grains insuffisamment secs. Les genres les plus fréquemment observés dans cette catégorie sont : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (Kermiche, 2013).

### I.2.4. Mycoflore de stock

Lors du stockage, les grains peuvent être infestés par des moisissures qui se développent à des teneurs en eau relativement faibles (Proctor, 1995). De plus, les dommages causés par les conditions de stockage peuvent favoriser ou sélectionner certaines populations de moisissures (Reboux, 2006). La mycoflore de stockage est principalement composée d'espèces des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Gwimer *et al.*, 1996), parmi lesquels les *Penicilliums* et les *Aspergillus* sont prédominants (Moreau, 1996; Feillet, 2000).

Les moisissures présentes sur les grains de blé stockés se présentent sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe des grains ou de spores en dormance à la surface des grains. Cependant, certaines moisissures sont seulement associées de manière superficielle aux grains stockés. Les genres principaux que l'on retrouve sont *Aspergillus* et *Penicillium* en raison de leur capacité à se développer sur divers types de substrats et dans une large gamme de conditions de température et d'humidité (Mathew *et al.*, 2011).

### I.2.5. Principales moisissures d'altération du blé stocké

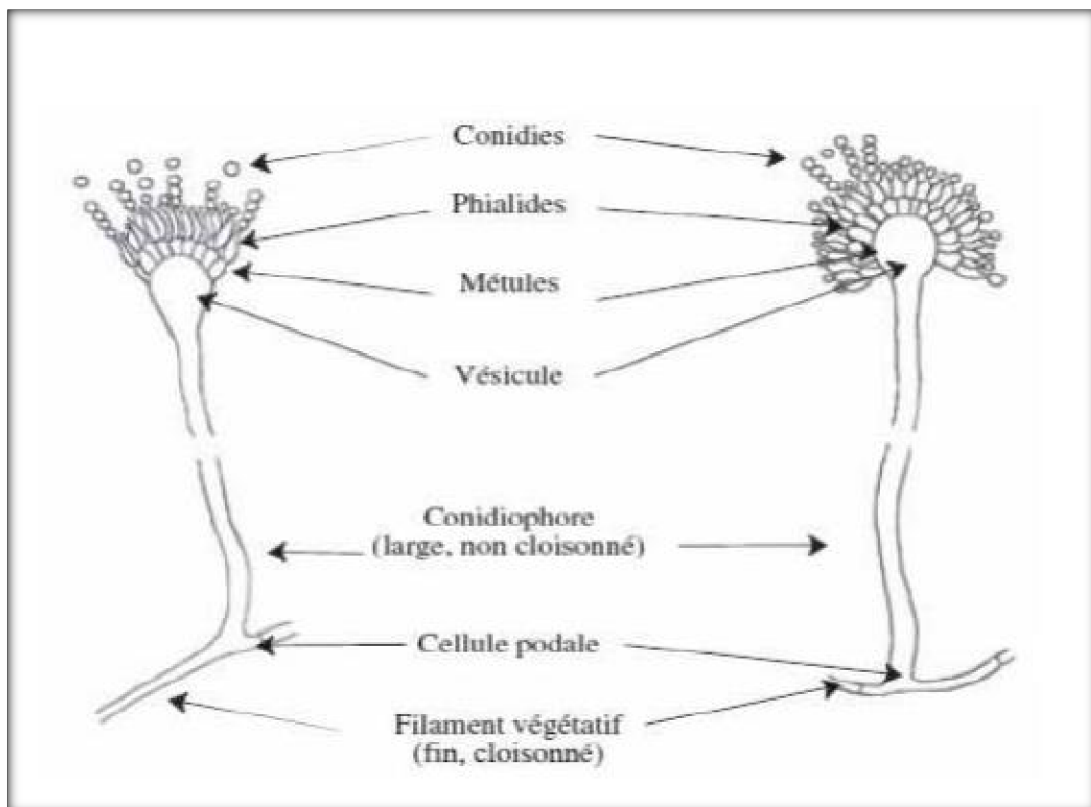
#### I.2.5.1. Genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des moisissures saprophytes qui ont la capacité de se développer dans divers environnements, y compris le sol, les déchets organiques, les composts et même sur des plantes déjà endommagées par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Ils peuvent également se trouver à la surface des graines. En cas de conditions de stockage inappropriées, ce genre de moisissures peut causer des maladies chez les humains et les animaux, telles que l'aspergillose pulmonaire, des allergies ou des mycotoxicoses (Schuster *et al.*, 2002).



Les *Aspergillus* ont une large plage de températures de croissance, allant de 6 à 47°C. Dans le cas des céréales stockées, ces moisissures se multiplient plus rapidement lorsque la température est élevée (pouvant atteindre jusqu'à 40°C) et que l'activité de l'eau est élevée (**Lisiecka et al., 2011**).

Ce genre de moisissures appartient à la classe et à la famille des Aspergillaceae au sein des Ascomycètes, à filaments cloisonnés, qui peuvent être hyalins ou colorés. Leur structure, appelée thalle, est composée d'un mycélium cloisonné portant de nombreuses conidiospores dressées, terminées en vésicules (**Fig.7**) (**Raper et Fennell, 1965**).

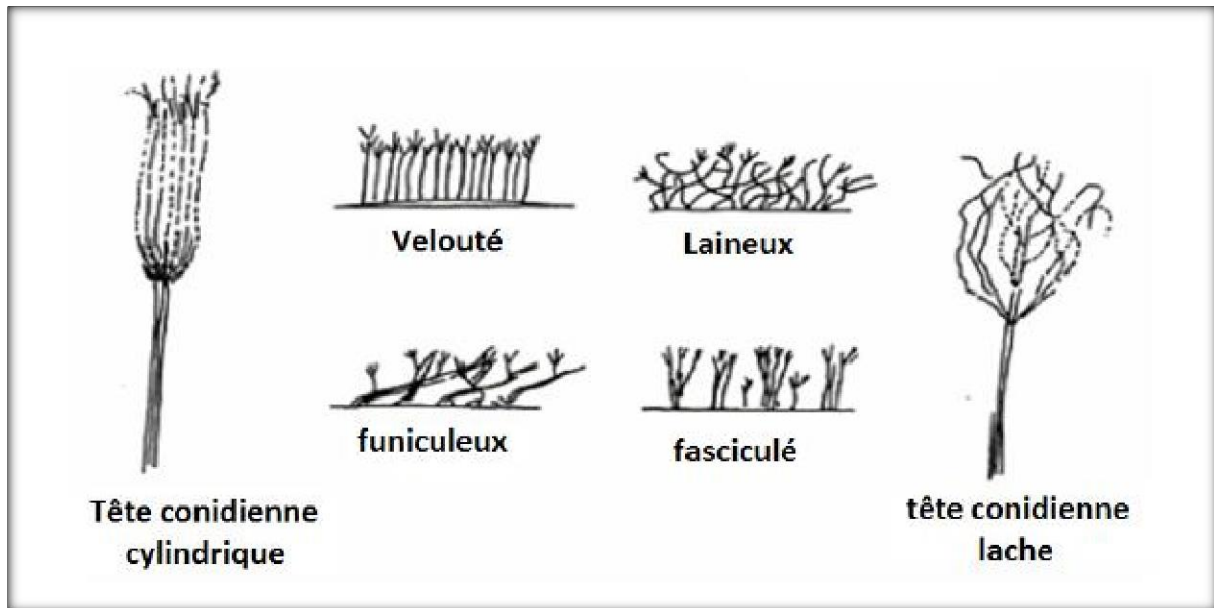


**Figure 7.** Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (**Tabuc, 2007**).

Lorsque les grains stockés présentent un taux d'humidité élevé, les *Aspergillus* peuvent rapidement passer d'un état saprophyte à un état parasitaire (**Meghazi, 2015**). Les espèces de ce genre les plus couramment observées dans les grains de blé stockés sont principalement *A. flavus*, *A. niger* et *A. fumigatus* (**Mathew et al., 2011**).

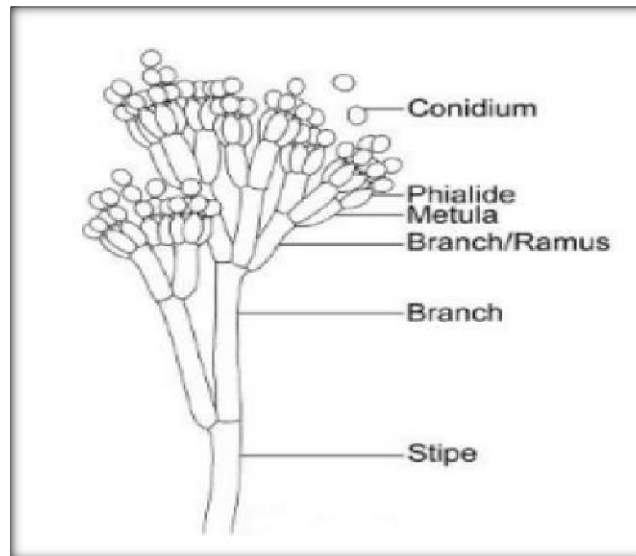
### I.2.6.2. Genre *Penicillium*

Ce genre regroupe des champignons filamenteux saprophytes qui peuvent éventuellement devenir parasites en présence d'humidité pendant le stockage. Il appartient au phylum des Ascomycètes. Environ 227 espèces de ce genre sont définies en fonction des caractéristiques de leur thalle. Une des caractéristiques distinctives de ce genre est l'aspect du conidiophore, qui est divisé en 4 articles (**Fig.8 et Fig. 9**) (**Pitt et Hocking, 1988**).



**Figure 8.** Caractères du thalle du genre *Penicillium* (**Tabuc, 2007**).

Les espèces appartenant au genre *Penicillium* ont généralement un niveau d'activité de l'eau supérieur à celui permettant la croissance des *Aspergillus*. Elles se développent également à des températures plus basses (**Tabuc, 2007**). Ces espèces sont moins fréquentes avant la récolte, mais elles commencent à se développer rapidement pendant le stockage. Au moment de la récolte, les graines peuvent ne montrer aucun symptôme de contamination, mais elles peuvent se détériorer au cours de la conservation (**Hajjaji et al., 2004**).



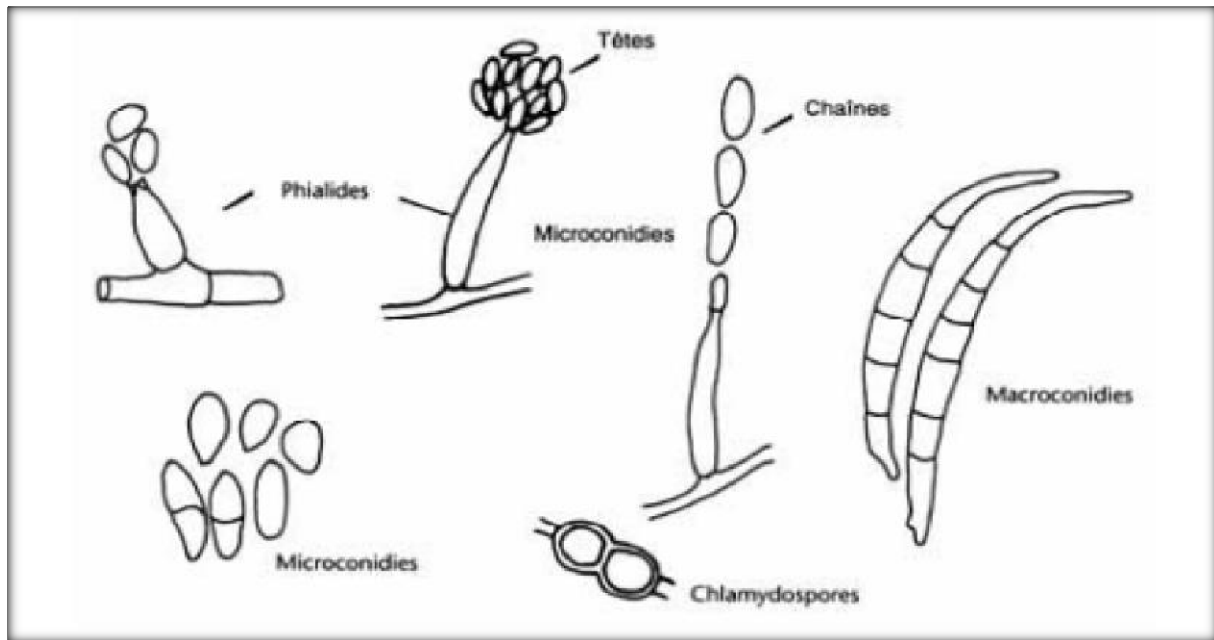
**Figure 9.** Schéma d'un pénicille (Pitt et Hocking, 1988).

Les espèces les plus courantes du genre *Penicillium* incluent principalement *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium hordei*, *Penicillium freii*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, et *Penicillium crustosum*. La majorité de ces espèces sont capables de produire des mycotoxines (Pitt et Hocking, 1988).

### **I.2.6.3. Genre *Fusarium***

Ce genre comprend des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Les formes parfaites ou téléomorphes de certaines espèces de *Fusarium* sont connues et appartiennent à la classe des Ascomycètes. On recense près de 40 espèces de *Fusarium* largement répandues dans la nature, certaines vivent en tant que saprophytes, tandis que d'autres sont des phytopathogènes (Le Calvez, 2009).

Le nom *fusarium* provient du latin "*fuscus*", car les spores de ces moisissures ont une forme de fuseau. La caractéristique morphologique principale des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (Fig.10) (Le Calvez, 2009).



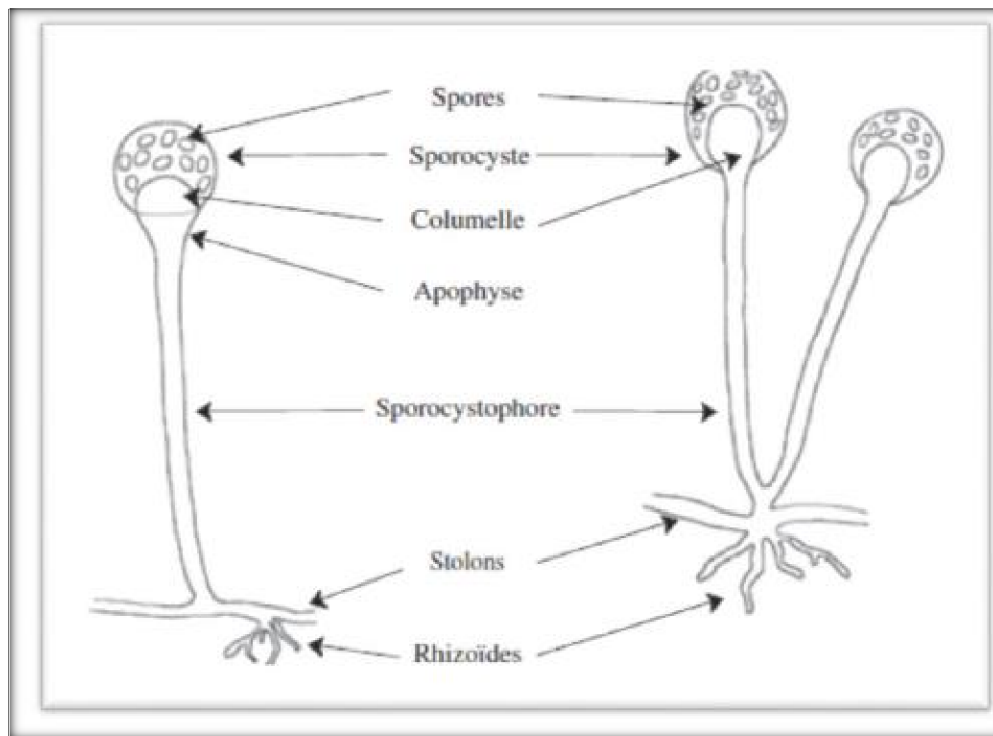
**Figure 10.** Caractères morphologiques des *Fusarium* (Le Calvez, 2009).

Ce genre a un impact négatif sur le rendement et la qualité des céréales en produisant des mycotoxines responsables de graves maladies. Les principales espèces de *Fusarium* incluent *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. verticilloides* (Aoues, 2017).

#### **1.2.6.4. Sous famille des Mucorales**

Cette sous-famille comprend les genres *Absidia* sp, *Mucor* sp, *Rhizomucor* sp et *Rhizopus* sp (Reboux *et al.*, 2010). Les mucorales sont des champignons présents partout dans le monde, se nourrissant de matière organique en se développant dans le sol. Ils sont courants dans la contamination des aliments tels que les céréales, les fruits et les légumes. Certaines espèces de mucorales peuvent causer des maladies chez les plantes.

Les champignons produisent généralement des stolons qui se propagent à la surface du substrat et adhèrent à celui-ci à l'aide de racines appelées rhizoïdes. Le thalle est constitué de filaments siphonnés sans cloison. À partir des stolons, des filaments dressés appelés sporangiophores se forment, portant des sporanges dans lesquels sont produites les spores (Fig.11) (Chabasse *et al.*, 2002 ; Meghazi, 2015).



**Figure 11.** Appareil reproducteur des mucorales (Chabasse *et al.*, 2002).

## I.2.7. Impact des moisissures sur le blé stocké

### I.2.7.1. Altération organoleptique

Les moisissures jouent un rôle actif dans la dégradation de divers produits alimentaires, ce qui peut se traduire par des altérations visuelles et gustatives (Millis, 1990). En conséquence, elles sont de bons indicateurs de la qualité générale des produits d'origine végétale, en particulier le blé (Guiraud et Rosec, 2004). Leur développement sur le blé peut entraîner la production d'odeurs de moisi qui se retrouvent ensuite dans les produits à base de blé, comme le pain (Portelli *et al.*, 1999).

Cette détérioration se caractérise par une diminution de la capacité de germination, une perte de couleur, des modifications chimiques et nutritionnelles, un durcissement et un mauvais goût, ce qui conduit souvent au rejet du produit (Millis, 1990).

L'activité des moisissures peut également entraîner des pertes de matière sèche et de valeur nutritionnelle, ainsi que des problèmes de santé dus à la formation de mycotoxines et de spores allergènes (Olsson, 2000). De plus, elle peut modifier les propriétés rhéologiques des grains (Molinie *et al.*, 2005).

### I.2.7.2. Production des mycotoxines dans le blé

Le terme "mycotoxine" provient de la combinaison des mots grec "mycos," signifiant champignon, et latin "toxicum," signifiant poison (Steyn, 1995; Pitt *et al.*, 2000). Les mycotoxines sont des substances chimiques produites par certaines moisissures qui ont génétiquement la capacité de produire des toxines. Elles se développent sur des denrées alimentaires, en particulier d'origine végétale, qu'elles soient sous forme brute ou transformée (Bourais et Amin, 2006; Reboux, 2006). De plus, certaines mycotoxines peuvent être présentes dans la viande et le lait d'animaux ayant consommé du blé contaminé ou moisi (Brochard et Le Bâcle, 2011).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatils, produits par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales (Hendey *et al.*, 1993). Ces molécules sont produits dans le mycélium des moisissures, mais ils peuvent s'accumuler dans des structures spécialisées telles que les phialides, les conidies ou les sclérotés, ainsi que dans l'environnement qui entoure l'organisme (Bhatnagar *et al.*, 2002).

Les mycotoxines sont principalement produites par cinq types de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). Elles peuvent être produites soit dans les champs pendant le développement des plantes (toxines du champ) soit après la récolte (toxines du stockage) (Fig.12) (Afssa, 2009).

Il existe environ 2500 mycotoxines répertoriées, mais les plus couramment rencontrées dans l'industrie alimentaire sont les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la zéaralénone, les fumonisines et la moniliformine. Ces dernières sont particulièrement préoccupantes lorsqu'il s'agit des céréales et des fruits secs (Barett, 2000; Bourais et Amin, 2006). Selon Terzi *et al.* (2015), on compte au moins 30 mycotoxines extrêmement toxiques, qui présentent différents modes de toxicité, notamment aiguë, chronique, mutagène et tératogène (Reboux, 2006).

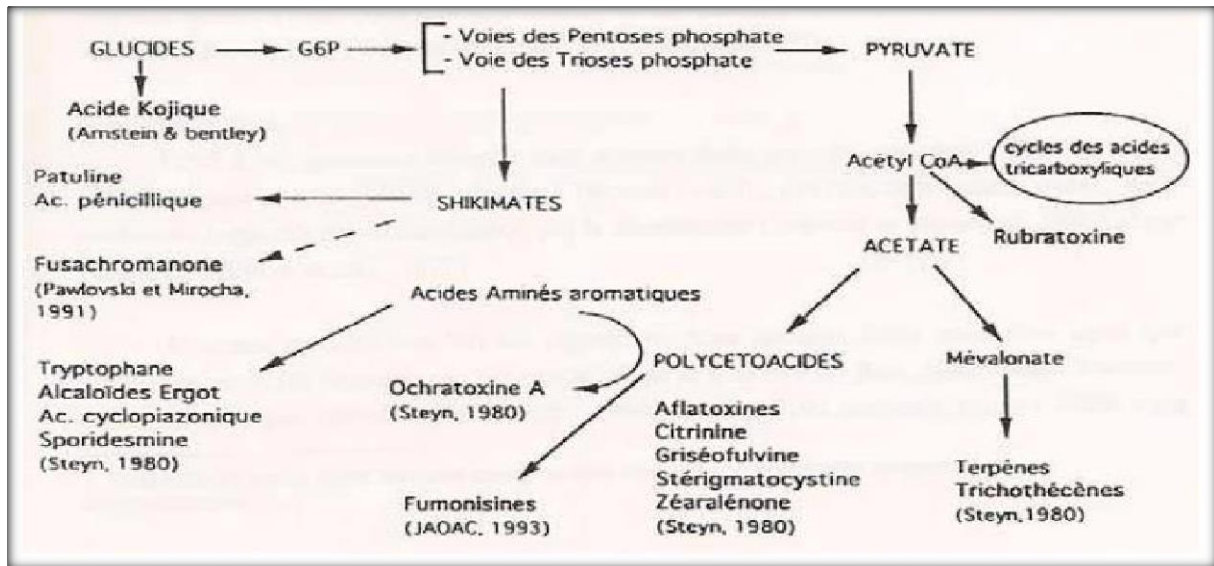


Figure 12. Voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc, 2007).

### I.2.8. Procédé de traitement du blé stocké

La protection des denrées stockées est souvent sujette à controverse, car les dommages surviennent parfois lorsque les récoltes sont encore sur pied (Giles et Ashman, 1971). Par conséquent, il est essentiel de mettre en place des méthodes de lutte visant à éliminer les microflores présentes dans les stocks (Kechroud, 2012).

La qualité initiale des grains, la gestion de la température, de l'humidité et de la composition de l'environnement, ainsi que l'utilisation de traitements physiques et chimiques sont essentielles pour contrôler l'activité microbienne (Multon, 1982). Il existe plusieurs méthodes de traitement des grains.

#### I.2.8.1. Lutte chimique

L'intérêt pour la lutte chimique contre les moisissures des grains humides en recourant à l'ammoniac gazeux ou en solution, afin d'inhiber leur développement, est en constante augmentation. (Multon, 1982). Cependant, certaines substances chimiques utilisées pour contrôler ces dégradations présentent un risque toxique significatif. Parmi ces substances, on peut citer l'oxyde d'éthylène (qui a des propriétés bactéricides et fongicides) et le bromure de méthyle (un pesticide et biocide) (Leyral *et al.*, 2003).

L'utilisation de ces produits peut entraîner des phénomènes de résistance chez les champignons pathogènes et l'accumulation de résidus (Flamini *et al.*, 2003). Bien que l'aldéhyde formique ait été utilisé avec succès pour lutter contre le développement des moisissures des grains, son utilisation comporte également certains inconvénients, notamment des problèmes d'odeur, de couleur et de perte d'activité enzymatique (Flamini *et al.*, 2003).



### I.2.8.2. Lutte physique

Dans le stockage des grains, diverses méthodes physiques sont couramment appliquées. Ceux les plus employées sont les atmosphères modifiées et l'irradiation gamma. Ces irradiations exercent une action létale sur les organismes vivants en induisant des modifications chimiques, même en quantités infimes, dans leurs molécules vitales. Il est à noter que les champignons producteurs de toxines sont plus sensibles à l'irradiation que d'autres micro-organismes (**Magan et al., 2004**).

Les méthodes physiques ont l'avantage de réduire ou d'éliminer l'utilisation de produits chimiques. Cependant, divers facteurs pratiques, techniques et biologiques limitent toujours l'utilisation des atmosphères modifiées et de l'irradiation gamma (**Magan et al., 2004**). Pour remplacer efficacement les produits chimiques, des doses de rayonnements ionisants très faibles sont nécessaires, généralement de l'ordre de 0,4 à 1 kGy (**Leyral et al., 2003**).

### I.2.8.3. Lutte biologique

Les levures et de nombreuses bactéries ont montré leur efficacité dans le contrôle de produits agricoles frais après la récolte. Les mécanismes par lesquels elles peuvent prévenir la croissance des moisissures et la production de mycotoxines incluent la compétition pour les nutriments, l'induction de mécanismes de défense, et des interactions hyper-parasitaires. Même si le contrôle biologique des moisissures sur les grains n'est pas encore pleinement réalisable, des avantages significatifs peuvent découler des recherches sur des micro-organismes antagonistes. Ces études pourraient conduire à la découverte de composés inhibiteurs de la croissance des moisissures et/ou de la production de mycotoxines lors du stockage (**Magan et al., 2004**).

Il est important de noter que la majorité des agents antifongiques naturels proviennent de sources microbiennes, avec près de la moitié étant synthétisée par des actinomycètes, en particulier les *Streptomyces*, qui sont largement répandus dans l'environnement. (**Eckwall et al., 1998**).

Egalement, les plantes médicinales sont utilisées efficacement dans les procédés de lutte biologique grâce à la diversité de leurs composants, tel que les huiles essentielles et les extraits polyphénolique, flavonoïques.. ect. Leurs activités antimicrobiennes découlent également des effets synergétiques de ces composants chimiques. Cette synergie explique la polyvalence des métabolites secondaires et leurs larges spectres d'action. En effet, elles inhibent la croissance des moisissures, des bactéries et des levures, ce qui en fait des agents antimicrobiens très efficaces (**Elshafie et al., 2023**).



### I.3. Insectes ravageurs des denrées stockées

#### I.3.1. Généralités

Les insectes ravageurs qui s'attaquent aux grains de céréales stockés sont considérés comme des déprédateurs redoutables en raison de leur capacité à prospérer dans un environnement de grains secs. Les céréales fournissent un milieu propice à leur prolifération. L'infestation des stocks peut avoir diverses origines, qu'il s'agisse d'une infestation au niveau du champ, de la chaîne de post-récolte ou des entrepôts. La contamination des denrées stockées peut résulter de la présence d'insectes dans les entrepôts, de la proximité de sources d'infestation ou de mélanges entre des grains sains et des grains contaminés. (**Inge de Groot, 2004**)

Ces insectes appartiennent principalement aux ordres des Coléoptères et des Lépidoptères. Les Coléoptères nuisibles incluent les larves et les adultes, tandis que chez les Lépidoptères, seules les chenilles sont préjudiciables (**Haines, 1997**).

Les insectes qui attaquent les grains de céréales stockés se divisent en trois catégories :

- **Les ravageurs primaires** : Ils sont capables de s'attaquer directement aux grains sains et intacts. Des recherches ont été menées pour évaluer les dégâts qu'ils provoquent. Des formules ont été développées pour estimer les pertes en matière sèche causées par des insectes comme *Sitophilus oryzae* et *Ryzopertha dominica* (**Bekon et Fleurat-Lessard, 1989**).
- **Les ravageurs secondaires** : Ces insectes ne peuvent détériorer les grains qu'une fois que des dégâts ont été causés par les ravageurs primaires, comme c'est le cas des *Tribolium*. Il est souvent difficile d'estimer les pertes en matière sèche dues à ces ravageurs secondaires (**Bekon et Fleurat-Lessard, 1989 ; Inge de Groot, 2004**).
- **Les ravageurs tertiaires** : Ils se nourrissent de graines cassées, de poussières de graines et de la poudre laissée par les groupes précédents (**Inge de Groot, 2004**).

### I.3.2. Charançon du riz « *Sitophilus oryzae* »

*Sitophilus oryzae* est classé comme étant l'espèce la plus nuisible à l'ensemble de la production céréalière, au niveau mondiale et national (Shelom et Noyes, 2001).

#### I.3.2.1. Morphologie

Le charançon du riz, également connu sous le nom scientifique de *Sitophilus oryzae*, est un petit insecte mesurant entre 2,3 et 3,5 millimètres de long. Comme les autres charançons, il se caractérise par la présence d'un rostre, une structure prolongée de la tête où se trouvent ses pièces buccales broyeuses, ainsi que des antennes composées de huit articles. Son pronotum est ponctué de manière arrondie et présente une rangée de gros points le long de son bord antérieur. Ce charançon a généralement une couleur allant du brun foncé au noir, et son corps à un aspect mat. Il est identifiable par la présence de deux tâches rousses sur chaque élytre, ce qui le distingue des autres coléoptères (Fig.13) (Rees, 2007).



**Figure 13.** *Sitophilus oryzae* adulte (Coleoptera : Curculionidae)  
(Belgique Hainaut Mons 2006) ( Cruz *et al.*,1988).

#### I.3.2.2. Cycle évolutif de *S.oryzae*

Le cycle de vie de *Sitophilus oryzae* se compose de quatre stades (Fig.14) : l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago

##### I.3.2.2.1. Œuf

Il est de forme ovale ou piriforme. Il a une couleur blanche opaque et brillante. À une extrémité, il présente une petite protubérance qui sert à sa fixation. Les dimensions de cet œuf sont

d'environ 0,6 à 0,7 mm de longueur et 0,2 à 0,3 mm de largeur, comme indiqué par **Steffan (1978)** et **Mahadevappa,(2003)**.

#### I.3.2.2.2. Larve

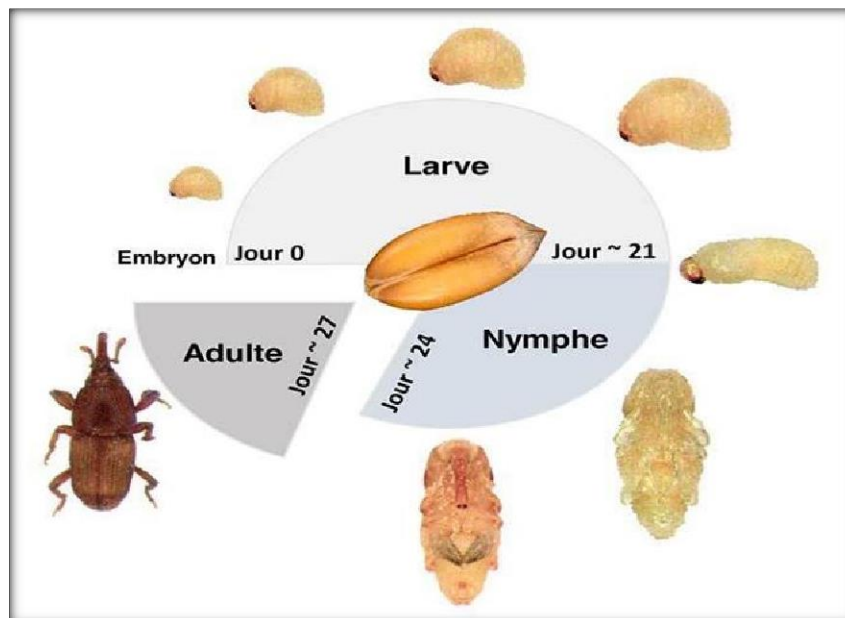
Elle est de couleur blanche et a une forme globuleuse avec une posture repliée. Elle se distingue des larves d'autres coléoptères des denrées par l'absence de pattes. Du point de vue physiologique, elle se caractérise par un petit nombre de mues, généralement 4 stades larvaires. Une larve mature mesure environ 2,5 à 3 mm de long (**Lepesme, 1944 ; Mahadevappa, 2003**)

#### I.3.2.2.3. Nymphe

Elle a une forme cylindrique et mesure environ 3,75 à 4 mm de long. Sa couleur évolue du blanc au brun à mesure qu'elle se développe, subissant la mélanisation et la sclérotinisation de la cuticule. À ce stade, elle atteint presque la taille de l'imago (**Lepesme 1944; Mahadevappa,2003**)

#### I.3.2.2.4. L'imago

C'est un petit coléoptère mesurant de 2,5 à 5 mm de long. Il se caractérise principalement par deux grandes taches ocre présentes sur chaque élytre. Son rostre est moins long que le pronotum, peu arqué et cylindrique dans sa partie antérieure. Les mâles se distinguent des femelles par un rostre plus épais, plus court et plus profondément ponctué. De plus, les derniers sternites abdominaux sont plus courbés ventralement chez les mâles que chez les femelles, comme décrit par **Lepesme,(1944)** et **Mahadevappa,(2003)**.



**Figure 14.** Stades de développement de *S. oryzae* (**Parisot et al., 2021**).

### I.3.2.3. Biologie du charançon du riz

*S. oryzae* est principalement actif la nuit, montrant une préférence pour l'obscurité. Leurs déplacements sont relativement rapides, et ils ont la capacité de voler, ce qui favorise leur dispersion rapide dans les entrepôts (Steffan,1978).

Les adultes s'accouplent peu de temps après leur émergence des grains. La copulation dure de 15 minutes à 1 heure et 30 minutes et se répète de nombreuses fois au cours de leur vie (Lepesme, 1944). Environ une à deux semaines après l'accouplement, la femelle pond ses œufs en les insérant à une certaine profondeur à l'intérieur du grain.

Des observations ont montré que les femelles sont sélectives dans le choix des grains pour la ponte. Elles sont capables de détecter la présence d'œufs ou de larves déjà présents à l'intérieur d'un grain. Par conséquent, elles évitent de pondre dans des grains déjà occupés. Lorsque la femelle de *Sitophilus oryzae* perce un grain, elle y dépose un œuf dans chaque trou (Fig.15), puis elle bouche le trou avec du mucus sécrété par son oviducte. Au cours de sa vie, une femelle peut pondre en moyenne 300 œufs, mais certaines peuvent en pondre plus de 500 (Paulian, 1988).

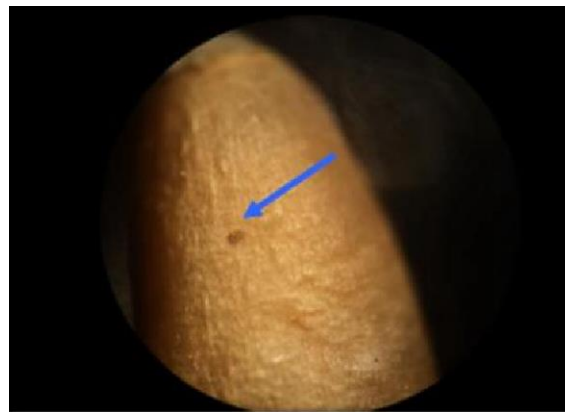


Figure 15. Trou de ponte de *Sitophilus oryzae* (Originale, 2013)

Dans des conditions environnementales propices, cet insecte traverse trois stades larvaires en environ un mois. La larve du dernier stade crée une sorte de chambre de nymphose où elle entre d'abord dans un stade prénymphe, qui dure de 20 à 50 heures, avant de se transformer en nymphe (Lepesme,1994).

Selon les observations de Lepesme (1944), les charançons hivernent à la fois à l'état adulte et larvaire. Pendant cette période, leur activité est réduite.

D'après Steffan (1978), les adultes émergent lorsque la température atteint 28°C et l'humidité relative est maintenue à environ  $70 \pm 5\%$ . Ces conditions sont considérées comme idéales pour leur croissance, et leur développement peut débuter lorsque la teneur en eau des grains dépasse

9%. Dans de telles conditions, le cycle de développement dure environ 25 jours. Leur longévité peut dépasser 4 mois.

#### I.3.2.4. Classification de *Sitophilus oryzae* :

Selon **Lepesme (1944)**, la position systématique de *Sitophilus oryzae* L. est la suivante :

- **Embranchement** : Arthropodes
- **S/embranchement** : Antennates
- **Classe** : Insectes
- **Sous-classe** : Ptérygotes
- **Super-ordre** : Coléoptéroïdes
- **Ordre** : Coléoptère
- **Sous-ordre** : Polyphaga
- **Super-famille** : *Phytophagoidea*
- **Famille** : Curculionidae
- **Sous-famille** : Rhynchophorinae
- **Genre** : *Sitophilus*
- **Espèce** : *Sitophilus oryzae* (L.)

#### I.3.2.5. Origine et répartition géographique

Selon **Balachowsky (1962)**, *S.oryzae* a été observé la première fois dans la région indienne. Il est rencontré dans les zones tropicales et subtropicales (Afrique du nord et Australie) ; *S. oryzae* est une espèce cosmopolite qui a réussi à se répandre dans le monde entier grâce aux échanges internationaux. Elle est présente dans presque toutes les régions du globe.

#### I.3.2.6. Régime alimentaire et dégâts

*S. oryzae* L. est un ravageur couramment présent dans les entrepôts, les moulins et les greniers, où il cause des dommages importants aux produits alimentaires. Cette espèce est opportuniste et se nourrit principalement de grains de blé, d'orge, de maïs, de riz et de produits à base de farine, ainsi que de denrées riches en amidon (**Huchet, 2016**).

A part les dommages réduits causés par l'adulte, c'est la larve qui est responsable des pertes pondérales car elle se développe aux dépens des réserves de grain, en dévorant aussi bien le germe que l'albumen, ne laissant que l'enveloppe perforée et rongée. Ainsi, les pertes pondérales peuvent être significatives proportionnellement au degré d'infestation et au taux d'expansion de l'espèce (**Rees, 2007**).

Si un couple de cette espèce est dans un stock de grains ou si les conditions de développement sont réunies, 50 individus seront dénombrés au bout d'un mois, 1250 au bout de deux mois et 488 millions environ au bout de six mois. Bien que ces données soient théoriques, elles peuvent nous donner une idée générale des risques de pullulation de cette espèce et des pertes pondérales en conséquence (**Steffan, 1978**).

Les charançons peuvent causer une perte de poids, une détérioration de la qualité et parfois une infestation par les champignons. En effet, les activités des ravageurs primaires comme les charançons favorisent les insectes secondaires et les micro-organismes, ce qui aggrave les dommages causés par les déprédateurs primaires (**Kranz et al., 1981**).



**Figure 16.** Dégâts de *S.oryzae* sur blé tendre (**Originale, 2013**).

### **I.3.2.7. Lutte contre *Sitophilus oryzae* L.**

#### **I.3.2.7.1. Lutte chimique**

Il existe deux types de traitements :

- Le traitement par contact, où le grain est revêtu d'une pellicule de produits insecticides agissant sur les insectes (**Crus et al., 1988**). Ces produits peuvent être utilisés sous forme de poudre ou après dilution.
- Le traitement par fumigation, où de petites molécules de gaz pénètrent à l'intérieur des grains et dans les fissures, leur permettant d'éliminer les insectes dissimulés. Deux produits de fumigation revêtent une importance économique majeure : l'hydrogène phosphoré ( $\text{PH}_3$ ) et le bromure de méthyle ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) (**Gwinner et al., 1996**).



### I.3.2.7.2. Lutte biologique

La lutte biologique consiste à introduire dans l'environnement des ravageurs des agents tels que des prédateurs, des parasitoïdes ou des micro-organismes pathogènes pour perturber leur développement ou les éliminer. Les insectes parasites ou parasitoïdes déposent leurs œufs à l'intérieur ou sur les ravageurs, ce qui finit par les tuer au terme de leur cycle de développement. Par exemple, des études menées au Niger ont montré que *Dinarmus basalis* est un agent de lutte très efficace lorsqu'il est seul, pouvant parasiter jusqu'à 90% des larves de *Callosobruchus maculatus*. Cependant, en cas de compétition avec d'autres agents, tels qu' *Eupelmus vuilleti*, qui adopte un comportement agressif dominant, l'efficacité de *Dinarmus basalis* peut être réduite.

Les prédateurs, ou entomophages, tuent directement leurs proies par une attaque physique. De plus, les phéromones et les hormones juvéniles sont utilisées dans la lutte biologique pour modifier le comportement des ravageurs. La lutte biologique est une approche prometteuse pour la gestion des ravageurs, mais son application est encore limitée dans les régions agricoles. (Kalogiannidis *et al.*, 2022)

### I.3.2.7.3. Phytopesticides

L'utilisation de plantes indigènes dans la conservation des récoltes est une pratique ancienne qui remonte à une époque antérieure à l'avènement des insecticides de synthèse (Gueye *et al.*, 2011). Les plantes sont employées pour lutter contre les ravageurs en raison de leurs propriétés répulsives, de contact ou fumigantes. Souvent, ces plantes sont déjà utilisées dans l'alimentation humaine, par exemple comme condiments ou épices, ou elles possèdent des propriétés médicinales. Les familles de plantes les plus prometteuses pour la protection des denrées pendant le stockage sont Meliaceae, Annonaceae, Labiaceae, Rutaceae, Asteraceae et Canellaceae. Les phytopesticides dérivés des huiles essentielles présentent un avantage significatif en raison de leur faible persistance dans l'environnement, de leur faible toxicité pour l'homme et de leur mode d'action sur les ravageurs (Ngamo et Hance, 2007; Pathak *et al.*, 2022).

## I.4. Modèles végétales employés

### I.4.1. Noyer commun :

#### I.4.1.1. Historique et origine :

*Juglans regia* ou le Noyer commun est un arbre majestueux (**Debuigne et Couplan ;2006**) qui appartient à la famille des Juglandacées, originaire du sud-est du bassin Méditerranéen jusqu'en Chine (**Dupérat et Polese ,2008**).

Les récits de l'antiquité grecque et romaine évoquent la culture des noix, dont l'arbre a été importé de Grèce par les romains qui lui ont fait ensuite traverser les Alpes (**Bärtels,1998**).

Le noyer était autrefois très cultivé par les berbères dans le Maghreb, aussi bien dans les plaines que dans les montagnes. D'après les historiens ,les Berbères cultivaient des forêts entières de noyers dans les régions montagneuses pour obtenir le Souak (écorce) ils n'hésitaient pas à écorcher les jeunes noyers ( **Delille,2010**).

Dans les théories des signatures, le noyer était employé pour les affections de la tête ; en 1842, Puzine utilisa les feuilles pour les maladies scrofuleuses (**Sallé,1991**).

En médecine traditionnelle Turque *Juglans regia* L. a été utilisée dans le traitement des perturbations hormonales, et le dysfonctionnement des glandes tel que la thyroïde (**Duke ,2004**).

A l'apogée de la civilisation arabo-islamique, et en médecine prophétique l'utilisation du noyer commun est très recommandée, on rapporte dans la Cira Nabaouia dans la parole Noble du Prophète (Que le salut soit sur lui) des recommandation pour l'utilisation du noyer (**El Dhahabi,1990**).

En Corée, au Japon et en Chine depuis les temps les plus anciens, l'enveloppe verte(Brou), les feuilles, la tige et l'écorce du genre *Juglans* (Juglandaceae) ont été largement utilisés en médecine populaire pour le traitement du cancer et les dermatoses (**Junxi liu et al.,2008**).

*Juglans regia* est connue plus particulièrement pour son principe actif, la Juglone, ce dernier confert à la plante une activité antimicrobienne, anti-tumorale, augmente l'activité motrice de l'animal. Elles peuvent être mises a profit au cours du traitement du diabète, les dermatoses et bien d'autre maladies (**Junxi Liu et al.,2008 ; Arnal et al.,2009**).

#### I.4.1.2. Etymologie

Le nom *Juglans regia* est originaire de la Perse antique, Juglans est une contraction des mots Jovis glans,Gland digne de jupiter,la bonté de son fruit lui a valu ce nom et l'épithète de regia,Royal ; les noix a peine mures sont appelées cerneaux, leurs écailles vertes sont nommées brou (**Deville,1828**).



Selon **Sallé(1991)** ; c'est un arbre consacré à Jupiter d'où son nom latin *Juglans regia*, il symbolisait au moyen âge l'union de mariage.

- En Français : Noyer royal ; Goguier, Calottier et Eclonnier, (**Arnal et al.,2009**),arbre au sommeil ,gland de jupiter , gland divin(**Delille,2010**) ;
- En Arabe : El Jouza ou souak (**Delille,2010**) ;
- En Berbère : Tadjoudjte (**Delille,2010**) ;
- En Inde : le noyer commun est appelé Akhort (**Kale et al., 2010**).

#### I.4.1.3. Systématique et classification botanique

Le genre *Juglans* appartient à la famille des juglandacées; le genre *Juglans* présente plus de vingt espèces .ce sont en général de grands arbres , rarement des arbustes(**Becquey .1997**)

Selon **Brosse(2010)**, le noyer blanc ou le noyer commun appartient :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Phanérogames
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous classe** : Apétales
- **Ordre** : Juglandales
- **Famille** : Juglandacées
- **Genre** :*Juglans*
- **Espèce** : *regia*
- **Genre-Espèce** : *Juglans regia* L.

#### I.4.1.4. Description botanique

Le noyer vit entre 150 à 200 ans, il développe un tronc droit mais assez court atteignant 15 à 25 m de hauteur, un houppier large et arrondi .Son enracinement est profond (**Dupérat et Polese ,2008 ; Arnal et al .,2009**)(**Fig. 17**).



**Figure 17.** Noyer commun (*Juglans regia* L.).

- **La Racine**

D'après **Becquey (1997)**, la racine est pivotante. Dès la première année, le pivot atteint 50 à 80 cm, puis il continue à s'enfoncer et peut aller jusqu'à 3 et même 5 m si le sol le permet. Généralement le pivot disparaît progressivement lorsque l'arbre vieillit.

- **L'écorce**

Elle est de couleur blanche argentée(**Fig. 18**) et lisse dans le jeune âge, sur les arbres les plus âgés elle brunit et se fissure en long (**Becquey,1997 ;Dupérat et Polese,2008**).



**Figure 18.** Ecorce de *Juglans regia* L.

- **Les Rameaux**

Ils sont gros anguleux, bruns luisant, et portent de larges cicatrices foliaires triangulaires situées sous le bourgeon (**Fig.19**).L'intérieur des rameaux est constitué d'une moelle cloisonnée. Les bourgeons globuleux et brun-noirs sont glabres et sont enveloppés de 2 écailles (**Dupérat et Polese ,2008**).



**Figure 19.** Rameaux de *Juglans regia* L.

- **Les Feuilles**

Elles apparaissent très tard au printemps, et sont de couleur brun rougeâtre à l'éclosion des bourgeons. Elles sont alternes, grandes (de 20 à 40 cm), composées de 4 à 8 paires de folioles ovales, plus une terminale, non dentées, vert clair sur la face supérieure, vert plus pâle sur la face inférieure (**Fig.20**). Elles ont un long pétiole dont la base est très renflée (**Dupérat et Polese ,2008**) et présentant une odeur caractéristique au froissement (**Becquey ,1997**)



**Figure 20.** Feuille de *Juglans regia* L.

A : Face inferieure, B : Face supérieure.

- **Les fleurs**

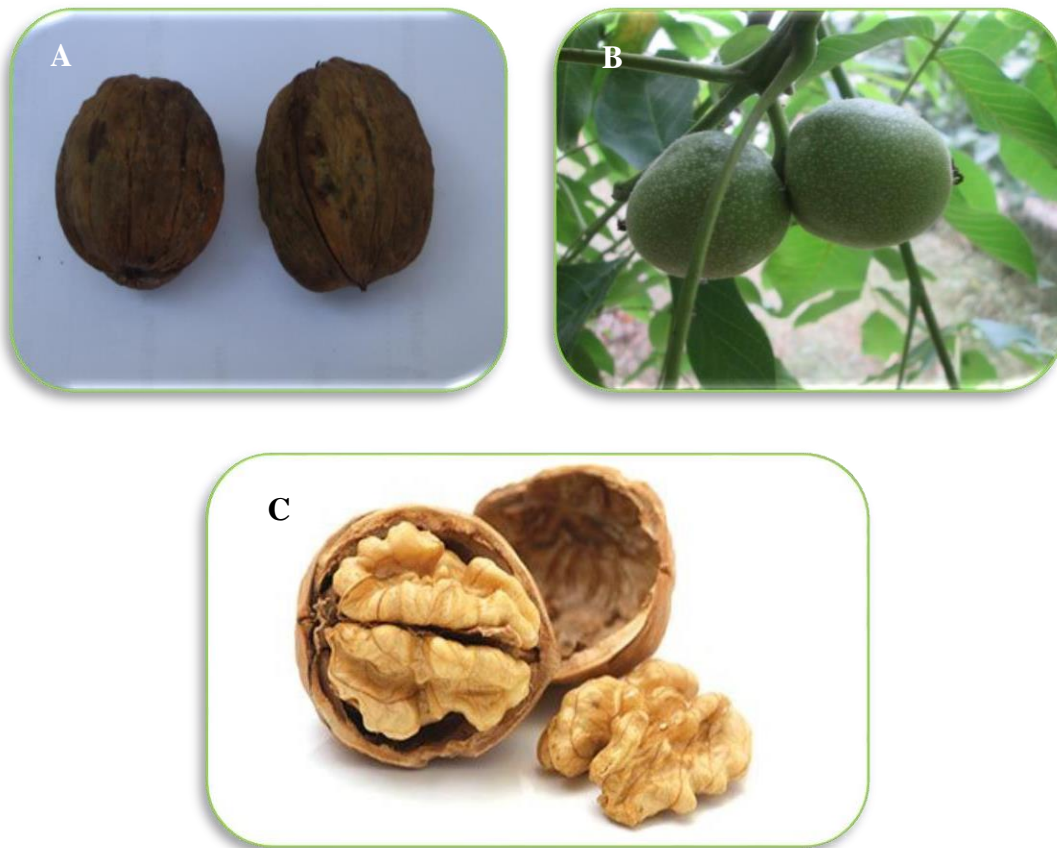
La floraison précède l'apparition des feuilles. Les fleurs mâles se présentent sous la forme de chatons mesurant de 5 à 10 cm de long, de couleur verte à jaune, et émergent sur les pousses de l'année (**Fig.21**). En ce qui concerne les fleurs femelles, elles sont globuleuses, regroupées par 2 ou 3, et sont caractérisées par des stigmates très larges (**Dupérat et Polese, 2008**).



**Figure 21.** Fleurs (chatons mâles et femelles) de *Juglans regia* L.

- **Le fruit**

Il a une forme sphérique d'un diamètre de 4 à 6 cm, se présentant sous la forme d'une noix à coque extrêmement dure avec deux valves enfermées dans une enveloppe épaisse et charnue, initialement verte, puis devenant brun-noir (**Fig.22 -A, B**) (**Dupérat et Polese, 2008**). À maturité, il s'ouvre de lui-même, et la fine peau de la noix est ridée, avec deux arêtes renflées, contrairement à d'autres variétés de *Juglans* (**Bartels, 1998**). À l'intérieur de la coque se trouve une amande (**Fig.22-C**), extrêmement riche en huile, offrant une saveur délicieuse et pouvant être consommée fraîche ou séchée (**Dupérat et Polese, 2008**).



**Figure 22.** Fruit de *Juglans regia* L.

**A** : sans le brou (enveloppe verte) ,**B** : avec le brou( enveloppe verte)

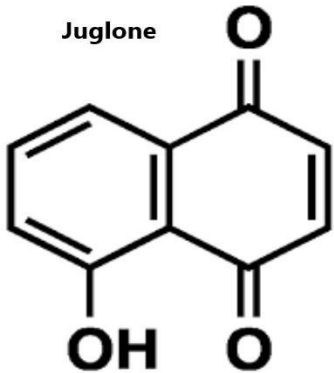
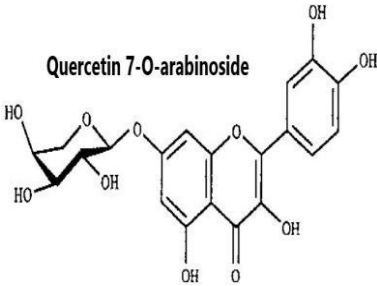
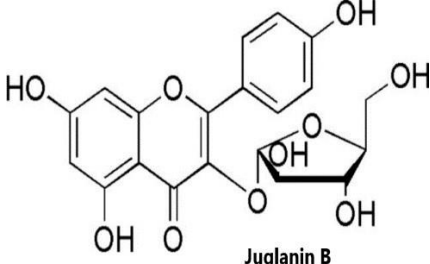
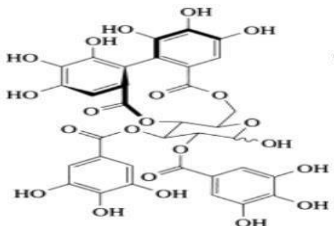
**C** : L'amande (Noix).



## I.4.1.5. Composition chimique

La composition chimique des différents organes varie en fonction de la situation géographique, des conditions climatiques et de la nature du sol (Gupta *et al.*, 2019). Les principaux constituants selon l'organe sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 2.** Composition chimique des différentes parties de *J.regia*.

Organe	Composé chimique	Structure
Les feuilles	Acides phénoliques, tanins, acides gras essentiels, acide ascorbique, flavonoïdes, acide caféique, acide paracomarique, juglone et ses dérivés (hydro-juglone), des huiles essentielles (D'Amelio et Frank, 1999 ; Amaral <i>et al.</i> , 2004 ; Gupta <i>et al.</i> , 2019)	<p><b>Juglone</b></p> 
	Flavonoïdes : Quercétine galactoside, dérivés pantosides de la quercétine, arabinoside de quercétine, xyloside de quercétine et rhamnoside de quercétine (Amaral <i>et al.</i> , 2004 ; Gupta <i>et al.</i> , 2019)	<p><b>Quercetin 7-O-arabinoside</b></p> 
Le brou vert du fruit	Emulsion, glucose, matières organiques telles que l'acide citrique, l'acide phosphate et l'oxalate de calcium, juglanine, sclérone D (Cosmulescu <i>et al.</i> , 2010, Delaviz <i>et al.</i> , 2017)	 <p><b>Juglanin B</b></p>
Le fruit	Acides gras, tocophérols, phytostérols, composés phénoliques, tanins (ellagitanins) (Zhao <i>et al.</i> , 2014; Gupta <i>et al.</i> , 2019)	 <p><b>Ellagitanins</b></p>

#### I.4.1.6. Habitat et exigences

L'arbre nécessite un vaste espace pour étendre sa large ramure et n'est généralement pas présent en forêt. On le trouve plutôt le long des routes, en bordure de champs et dans les cours de fermes dans certaines régions. Plus que les hivers froids, il redoute particulièrement les gelées tardives, qui peuvent affecter les fleurs et les jeunes pousses feuillées, bien qu'elles apparaissent tardivement. Pour prospérer, il préfère un sol riche, profond et frais, mais non détrempé. Dans de nombreux pays, il s'est naturalisé et peut se régénérer spontanément. Il fait l'objet d'une culture délibérée, non seulement pour la production de noix mais aussi pour son bois. Dans les zones excessivement humides, il est souvent greffé sur une autre espèce, le noyer noir (*Juglans nigra*) (Dupérat et Polese, 2008).

#### I.4.1.7. Répartition

Le noyer était probablement indigène dans les Balkans, et il semble que l'arbre soit arrivé d'Asie via l'intermédiaire des Perses, sa culture se répandant à la fois en Extrême-Orient et en Europe occidentale (Bonev, 1973). Il est largement cultivé en Europe, principalement en France, en Italie, en Yougoslavie et en Roumanie (Bärtels, 1998). Sa culture s'est également développée en Asie, en Europe, en Afrique du Nord, en Amérique et en Australie (Ouis et Zitouni, 1996). La Californie est le principal producteur de noix, avec les plantations californiennes produisant plus de noix que l'ensemble des pays du bassin méditerranéen (Bärtels, 1998).

En Algérie, selon Bonev (1973), le noyer est présent dans le massif de l'Aurès, les régions d'Annaba, de Sétif, la grande Kabylie, Tlemcen, Tebessa, Djelfa, Saïda, et près de Sougueur au sud de Tiaret.

#### I.4.1.8. Vertus thérapeutiques des feuilles du Noyer commun

Les feuilles de noyer possèdent des propriétés astringentes, parfois utilisées pour traiter les diarrhées légères et les inflammations gastro-intestinales. Elles sont également employées en cas de jambes lourdes, pour soigner les hémorroïdes et les inflammations cutanées. En lotion, elles sont appliquées sur les crevasses, les gerçures, les piqûres, les coups de soleil, les brûlures légères et les démangeaisons (Debuigne et Couplan, 2006 ; Nasiry et al., 2021)

Ces feuilles ont également des propriétés toniques, stimulantes, antiseptiques, stomachiques et dépuratives, recommandées contre le rachitisme, le lymphatisme, les tuberculoses pulmonaire et osseuse. Leur action est particulièrement marquée sur l'appareil digestif et le tonus

musculaire, stimulant le foie et la circulation tout en purifiant le sang. Grâce à leurs activités astringentes, elles présentent des effets anti-diarrhéiques, et l'huile essentielle qu'elles renferment confère à la plante une activité antifongique (**Bhat et al., 2023**).

Les feuilles de noyer étaient également appréciées dans les traitements du diabète, notamment du diabète gras "hépatique", agissant favorablement sur les métabolismes perturbés en provoquant une diminution notable de la glycémie, réduisant la soif et les mictions trop fréquentes chez les diabétiques, tout en évitant les complications de la maladie (**Debuigne et Couplan, 2006; Arnal et al., 2009; Ali-Dellile, 2010;**

En ce qui concerne les soins externes, la décoction des feuilles de noyer était traditionnellement utilisée contre la leucorrhée et l'inflammation de l'utérus, certaines variétés d'eczéma, les croûtes de lait, les ulcères et les plaies variqueuses, les angines, l'irritation des paupières, les pellicules et la chute des cheveux (**Bennacer et Chérif, 2017 ; Bennacer et al., 2021; Nasiry et al., 2021 ; Bhat et al., 2023**). Egalement, la teinture préparée avec des feuilles fraîches est utilisée contre la scrofule, le rachitisme, l'arthrose, la gastro-entérite et comme vermifuge (**Iserin et al., 2007**).

#### **I.4.1.9. Propriétés biopesticides**

Les feuilles de noyer produisent du juglone qui après lessivage par les pluies, par un phénomène d'allélopathie, empêche les autres plantes de pousser autour du noyer, des études ont démontrés également, que le noyer commun par son principe actif le juglone inhibe la germination des graines dans le sol de plusieurs mauvaises herbes (**Rietveld, 1983 ; Kocaçaliskan and Terzi, 2001**).

Les feuilles de *J.regia* L. présentent des propriétés insecticide contre des insectes ravageurs de culture, également des propriétés antifongique contre des champignons phytopathogènes sont présent (**Wianowska et al., 2016 ; Sadeghnezhad et al., 2023**).



## I.4.2. Olivier cultivé

### I.4.2.1. Historique et origine

L'olivier (*Olea europaea* L.) est un arbre emblématique, largement cultivé dans le bassin méditerranéen depuis au moins 3500 avant Jésus-Christ. Dans la mythologie grecque et romaine, il était un symbole de fécondité, de paix, de victoire, de richesse et de fidélité (**Besnard et Berville, 2005**).

Selon **Miner (1995)**, l'origine de l'olivier se situe principalement dans les pays bordant le berceau des civilisations méditerranéennes tels que la Syrie, l'Égypte, le Liban, la Grèce et Rome. Bien que d'autres hypothèses existent, celle de Decandolle, qui identifie la Syrie et l'Iran comme les lieux d'origine de l'olivier, est la plus fréquemment retenue (**Loussert et Brousse, 1978**). L'expansion de la culture de l'olivier s'est déroulée de l'Est vers l'Ouest de la Méditerranée grâce aux Grecs et aux Romains lors de leur colonisation du bassin méditerranéen (**Loussert et Brousse, 1978; Breton et al., 2006; Artaud, 2008**).

Dans la culture arabo-musulmane, le Coran évoque "cet arbre sacré" et l'huile d'olive comme un condiment (Sourate XXII "Les croyants, verset 20" et Sourate XXIV "La lumière, verset 35"). L'olivier est respecté, notamment en raison de ses vertus mentionnées dans le Coran, qui sont également confirmées par des études scientifiques (**Cheikh, 2016**).

### I.4.2.2. Etymologie

- Français : olivier ;
- Anglais : olivetree ;
- Allemand : olbaum ;
- Italien : ulivo ;
- Espagnol : olivo (aceituna) ;
- Portugais : oliveira (azietona) ;
- Arabe : chajaret azzeitoun (zeitouna) ; (**Ghedira ,2008**)
- Kabylie et dans haut Atlas au Maroc : Azzemmour (**Boudribila, 2004**)

### I.4.2.3. Systématique et classification botanique

Selon Ghedira (2008), la position taxonomique de l'olivier est la suivante :

- Règne : Plantae ;
- Embranchement : Magnoliophyta ;
- Sous-embranchement : Magnoliophytina ;
- Classe : Magnoliopsida ;
- Sous-classe : Asteridae ;
- Ordre : Scrophulariales ;
- Famille : *Oleaceae* ;
- Genre-Espèce : *Olea europae L.*
- Sous-espèces : *Olea europae subsp. europaeae var. sylvestris.*

*Olea europae subsp. europaeae var.europaeae.*

### I.4.2.4. Morphologie et description botanique de l'olivier

L'olivier (*Olea europae L.*) est une variété domestique de l'oléastre, appartenant à la famille des Oléacées (Fig.23) (Bruneton, 2009). Cet arbre, toujours vert, présente des dimensions et des formes extrêmement variables. L'olivier se caractérise par sa longévité, pouvant vivre plusieurs siècles, voire même un millénaire. Il atteint généralement une hauteur de 6 à 8 mètres (pouvant atteindre 10 mètres), avec un tronc tortueux et une écorce grisâtre et crevassée. Ses nombreux rameaux tortueux portent des feuilles persistantes (Amouretti et Brun, 1993).



**Figure 23.** Arbre d'olivier cultivé.

Les feuilles de l'olivier sont entières et lancéolées, disposées de manière opposée le long des branches avec un pétiole de courte longueur, comme c'est typique pour toutes les Oléacées. Leur taille varie entre 3 et 8 cm de longueur et de 1 à 2,5 cm de largeur, selon les variétés (Fig.24) (Loussert et Brousse, 1978).



**Figure 24.** Feuilles d'olivier cultivé.

Les fleurs de l'olivier, petites et de couleur blanc jaunâtre, se présentent en grappes à l'aisselle des feuilles (Bernie *et al.*, 2006) (Fig.25).



**Figure 25.** Fleurs d'olivier (Khalil,2017).

Le fruit, appelé olive, est une drupe ellipsoïde qui est verte puis devient noire à maturité, avec un noyau dur de forme fusiforme (Amouretti et Brun, 1993) (Fig.26). Le système racinaire de l'olivier s'adapte à la structure des sols, se maintenant à une profondeur de 500 à 700 cm et se localise principalement sous le tronc (Maillard, 1975; Loussert et Brousse, 1978).



**Figure 26.** Fruits d'olivier (Khalil, 2017).

L'oléastre se distingue morphologiquement de l'olivier cultivé par la présence de pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille et une faible teneur en huile (Terral et Arnold-Simard, 1996). Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne (Fig.27), et les fleurs sont plus petites. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages ont une forme elliptique et un poids réduit (Hannachi *et al.*, 2008).

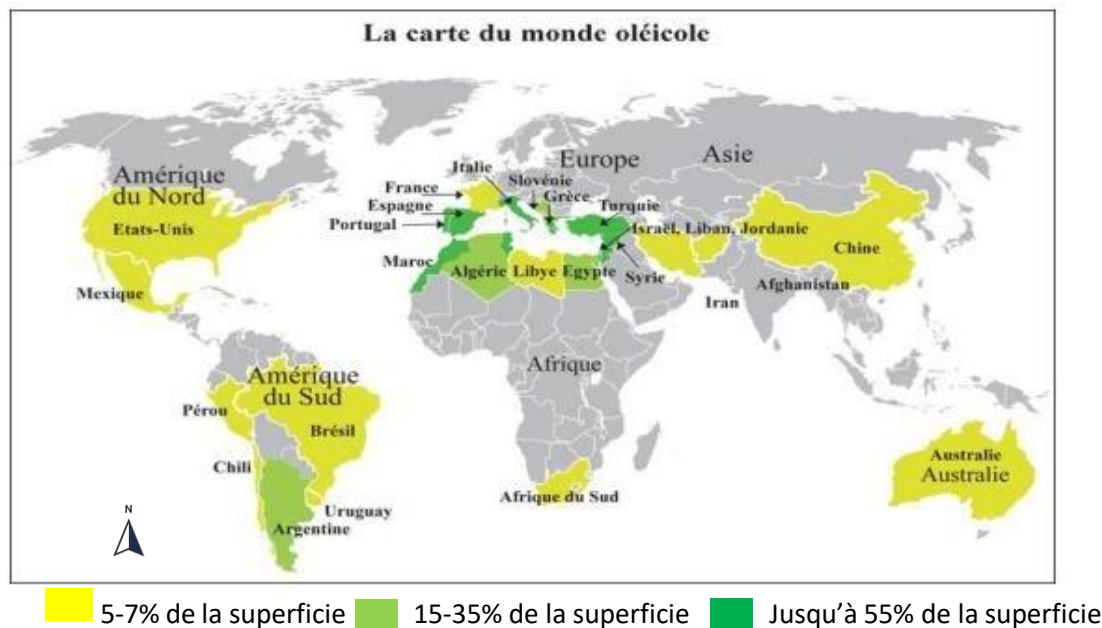


**Figure 27.** Feuilles d'oleastre.

#### I.4.2.5. Distribution géographique

L'olivier est actuellement cultivé dans toutes les régions du monde situées entre les latitudes 30° et 45° des deux hémisphères (**Fig.28**), couvrant des régions des Amériques (Californie, Mexique, Brésil, Argentine, Chili), de l'Australie jusqu'en Chine, en passant par le Japon et l'Afrique du Sud (**Benhayoun et Lazzeri, 2007**).

Du point de vue des botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est souvent associée à la "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea* L.) est cultivé depuis très longtemps autour de la Méditerranée et de la mer Noire, notamment en Espagne, en Italie, en Grèce, en Turquie, en France, en Tunisie, en Algérie et en Croatie. Bien que les plantations se trouvent désormais également en Californie, en Australie et en Afrique du Sud. Cette répartition géographique est fortement influencée par des facteurs climatiques et pédologiques (**Gaussorgues, 2009; Carrion et al., 2010**).



**Figure 28.** Carte oléicole mondiale (COI, 2018).

En Algérie, la superficie oléicole est répartie dans trois zones majeures :

- La zone centrale, principalement située dans le nord du pays, représente 54,3 % de la superficie oléicole nationale. Les wilayas de Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaia, Blida et Boumerdes sont incluses dans cette région. La Kabylie, composée de Bouira, Bejaia et Tizi-Ouzou, détient à elle seule près de 44 % de la superficie oléicole nationale.



- La zone Est représente 28,3 % du patrimoine oléicole national et englobe notamment les wilayas de Jijel.
- La zone Ouest représente 17 % du verger oléicole national et est répartie entre cinq wilayas, à savoir Tlemcen, Aïn Temouchent, Mascara, Sidi Bel Abbes et Relizane.

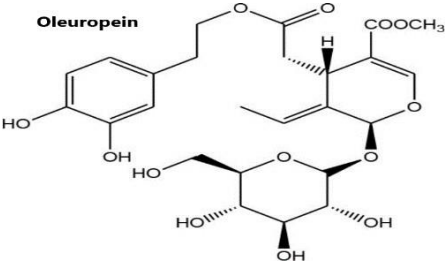
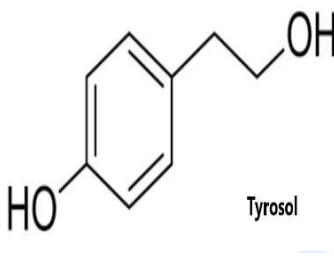
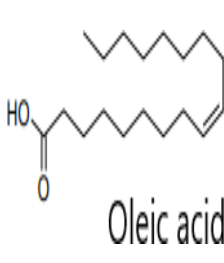
La wilaya de Bejaia occupe la première place à l'échelle nationale avec une superficie oléicole de 58 059,38 hectares (DSA, 2017).

L'oléiculture a émergé au nord de l'Algérie en 1999, dans des régions telles que Chlef, Guelma, Sétif et Boumerdès. Au fil du temps, elle s'est développée dans les régions sahariennes telles que Biskra, Bechar, Saida et Batna.

#### I.4.2.6. Composition chimique

La composition chimique des feuilles d'olivier varie en fonction de plusieurs facteurs tels que la variété, les conditions climatiques, l'époque de prélèvement, la proportion de bois, l'âge des plantations, etc. (Nefzaoui, 1995). La composition chimique de l'olivier est représentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 3.** Composition chimique des différents organes d'*O.europaea* L.

Composition chimique et structure		
Les feuilles	Les fleurs	Le fruit
Hydroxytyrosol, verbascoside, l'apigénine-7-glucoside, lutéoline-7-glucoside, oleuropéine; tanins (tanins galliques,anthocyanidine),flavonoïdes (lutéoléine, catéchine, hespéridine, quercetine et naringénine)( <b>Khelouf et al., 2018</b> )	Composés terpénique, flavonoïdes, oleuropein, oleofloside A,oleofloside B,oleanolic acid , Aesculetin, tyrosol ( <b>Apostolis et al., 2020</b> )	Acides gras (acide oleique, acide palmitique ect),flavonoïdes (rutine),glucose,fructose . ( <b>Cirilli et al.,2016</b> )
 <p>Oleuropein</p>	 <p>Tyrosol</p>	 <p>Oleic acid</p>

#### I.4.2.7. Vertus thérapeutiques des feuilles d'olivier

La feuille d'olivier présente des effets considérablement bénéfiques pour la santé humaine. Elle possède des propriétés hypotensives, diurétiques légères, hypoglycémiantes, et hypocholestérolémiantes (Bennani *et al.*, 1999). En plus, elle démontre des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, et anticancéreuses (Garcia *et al.*, 2006 ; Khelouf *et al.*, 2023). Plusieurs études ont mis l'accent sur le contenu des feuilles d'olivier et l'extraction de ces composés à haute valeur ajoutée, justifiant ainsi leur utilisation dans les industries pharmaceutiques, alimentaires, et cosmétiques (Altiok, 2008).

De plus, les feuilles d'olivier étaient également utilisées en cataplasme pour traiter les brûlures, les éruptions cutanées, les verrues et désinfecter les blessures cutanées. Les Anciens attribuaient à ces feuilles des vertus antiseptiques et la propriété de combattre diverses infections (Bruneton, 2009 ; Apostolis *et al.*, 2020 ).

#### I.4.2.8. Propriétés biopesticides

Le composé le plus connu présent dans les feuilles et les fruits est l'oleuropéine, un polyphénol responsable de l'amertume des olives mûres. Cette molécule est également considérée comme un composé anti-neurodégénératif due son effet insecticide contre une large gamme d'insectes ravageurs (Jemai *et al.* 2009 ; Zari *et Al-Attar* 2011 ; Pantano *et al.* 2016 ;Di Ilio *et Cristofaro* , 2021)

D'autant plus, la présence d'une large gamme de métabolites secondaires dans les feuilles de cette plante est responsable de ses potentialités antifongiques et antibactériennes contre les souches responsables de maladies phytopathogènes tel que : *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Xanthomonas* sp ( Elhrech *et al.*, 2024).

## I.5. Métabolites secondaires d'origine végétale

### I.5.1. Généralités

Les métabolites secondaires ou produits naturels peuvent être définis comme un groupe hétérogène de produits métaboliques naturels qui ne sont pas essentiels à la croissance végétative de la plante productrice, mais ils sont considérés comme des composés de différenciation qui confèrent des rôles adaptatifs ; par exemple, en fonctionnant comme des composés de défense ou des molécules de signalisation dans les interactions écologiques, la symbiose, le transport des métaux, la compétition, etc. (Tiwari *et al.*, 2015)

Les métabolites secondaires sont également exploités par l'homme dans divers domaines, principalement pour améliorer sa santé (domaine pharmaceutique) et son environnement (en agriculture) contribuant ainsi à différents aspects économiques de la société (Demain *et al.*, 2000).

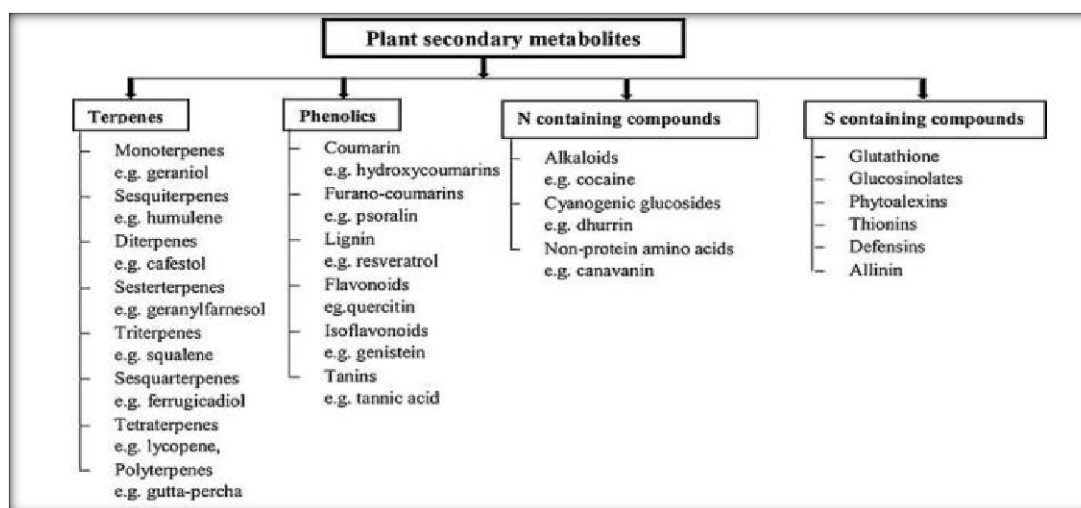
### I.5.2. Classification des métabolites secondaires

Les plantes produisent naturellement une variété de produits de nature chimique différente, qui sont utilisés pour la croissance et le développement des plantes. Les métabolites primaires fournissent les éléments nécessaires aux processus tels que la photosynthèse, la translocation et la respiration. Les produits dérivés des métabolites primaires, qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance et le développement, sont considérés comme des métabolites secondaires. En général, les métabolites secondaires sont le produit de métabolites primaires et sont issus de modifications de la biosynthèse, notamment la méthylation, la glycosylation et l'hydroxylation. Les métabolites secondaires sont certainement plus complexes dans leur composition structurelle et leurs chaînes latérales par rapport aux métabolites primaires (Ehrlich et Holdren, 1971 ; Figueredo *et al.*, 2008).

Il existe trois grandes classes de métabolites végétaux (Fig.29) basées sur la voie de biosynthèse:

- Les groupes phénoliques (composés de sucres simples et d'anneaux benzéniques),
- Les terpènes et les stéroïdes (composés principalement de carbone et d'hydrogène),
- Les composés azotés (Saxena *et al.*, 2013).



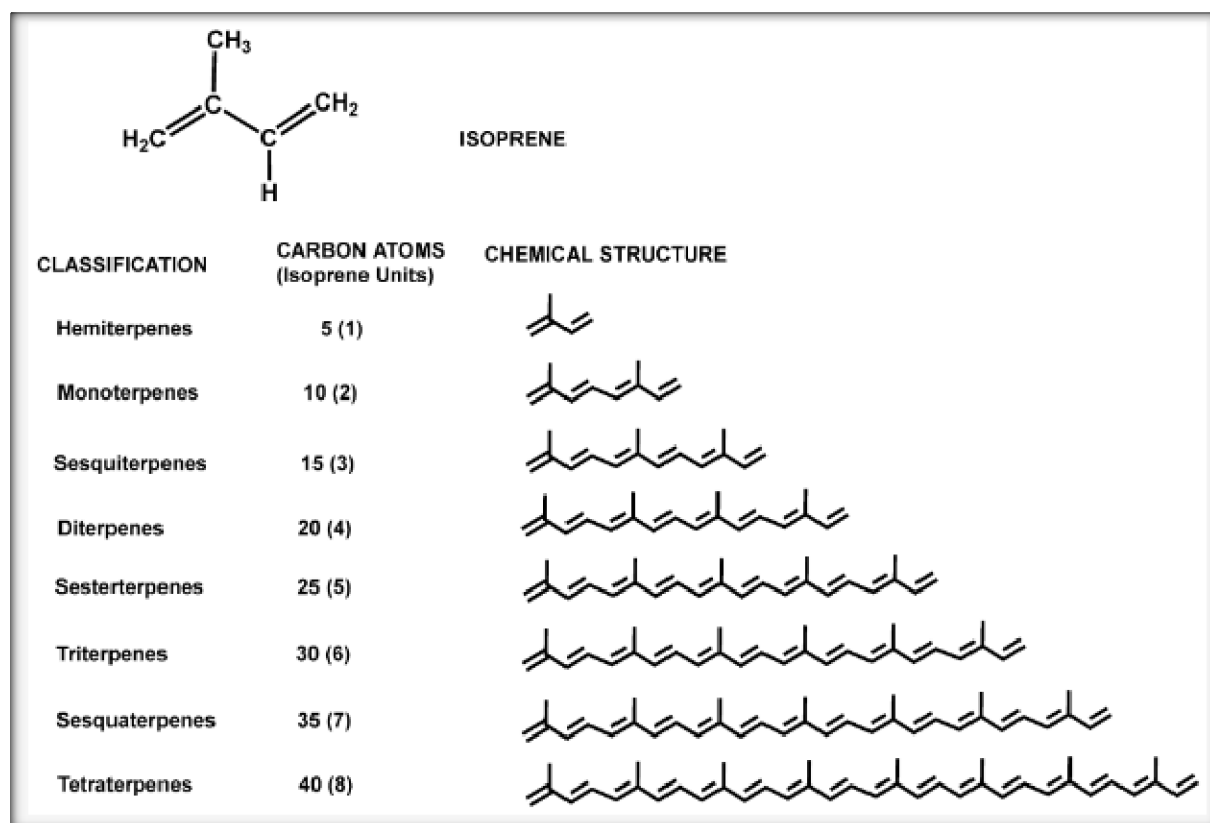


**Figure 29.** Quatre grands types de métabolites secondaires qui possèdent les principaux terpènes et phénols (Twajj et Hasan, 2022).

### I.5.2.1. Terpènes et les stéroïdes

Les terpénoïdes constituent la famille de produits naturels la plus vaste et la plus diversifiée. Tous les terpénoïdes sont synthétisés par la condensation d'unités isoprènes (C<sub>5</sub>) et sont classés en fonction du nombre d'unités à cinq carbones présentes dans la structure de base (Mahmoud *et al.* 2002) (Fig.30).

Ils peuvent être classés selon le nombre d'unités isopréniques et le nombre d'atome de carbone C<sub>5n</sub> (hémiterpènes, en C<sub>5</sub> ; monoterpènes, en C<sub>10</sub> ; sesquiterpènes, C<sub>15</sub> ; diterpènes, en C<sub>20</sub> ; sesterpènes, en C<sub>25</sub> ; triterpènes en C<sub>30</sub> ; tétraterpènes , en C<sub>40</sub> ; et polyterpenes avec un nombre plus important d'unités isopréniques), selon le nombre de structures cycliques qu'ils contiennent ( cyclique, monocyclique, bicyclique), et l'arrangement des cycles (Rohdich *et al.*, 2005). Les terpénoïdes constituent donc un groupe hétérogène de molécules avec différentes propriétés physique et chimiques. Ils sont volatils, semi-volatils, non volatils, saturés ou insaturés à chaînes droites ou ramifiée, cycliques ou acycliques, chiraux ou non superposables, portant divers groupes fonctionnels oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones esters, éthers phénols et acides ou époxydes) ou contenant de l'azote ou du soufre, et sont solubles ou insolubles dans l'eau (Bohlmann et Keeling, 2008)



**Figure 30.** Structure chimique d'isoprène et classification des terpènes en fonction du nombre d'unité d'isoprène (Mosquera *et al.*, 2021).

De nombreuses molécules aromatiques, comme le menthol, le linalol, le géraniol et le caryophyllène sont formées de monoterpènes (C10), avec deux unités d'isoprène, et de sesquiterpènes (C15), avec trois unités d'isoprène. D'autres composés bioactifs, tels que les diterpènes (C20), les triterpènes (C30) et les tétraterpènes (C40), présentent des propriétés très particulières (Mosquera *et al.*, 2021)

Pour les stéroïdes, l'IUPAC considère que les stéroïdes se caractérisent par la présence d'un groupe hydroxyle OH sur le carbone C3 (exemple, le cholestérol), et incluent tous les lipides possédant un noyau cyclo-pentano-phénanthérique (Muanda, 2010), ou dérivant de celui-ci. Cette diversité chimique provient de la complexité de leurs voies biosynthétiques (Bohlmann et Keeling, 2008).

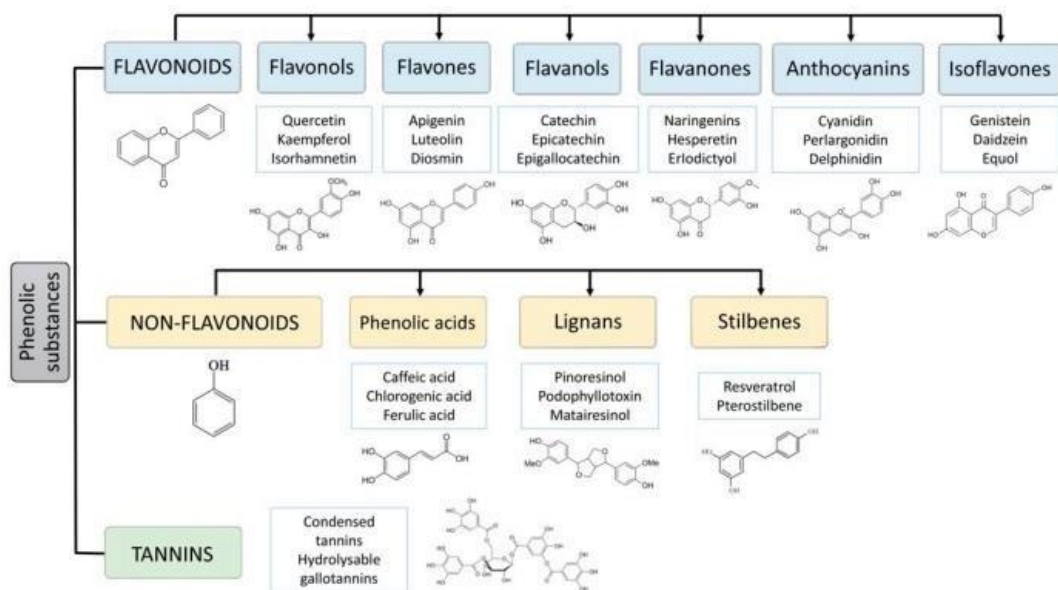
Les terpènes ont pour origine biosynthétique l'acétyl CoA ou malonyl CoA, ils proviennent des précurseurs simples à 5 atomes de carbone, l'isopentenyl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) (Sapir-Mir *et al.*, 2008). Deux voies distinctes sont actuellement connues chez les organismes vivants pour la biosynthèse de l'IPP et son isomère

DMAPP : la voie de l'acide mévalonique (MAV) et la voie indépendante du 2-C-méthyl-D-erythritol phosphate (MEP) (Randrianarivelo, 2010)

### I.5.2.2. Composés phénoliques ou polyphénols

Les polyphénols forment une grande famille très diverse en acides phénoliques, tanins, lignines, ect. La structure de base est le phénol, un cycle aromatique hydroxyle. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique, portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside. (Rana *et al.*, 2022) (Fig.31).

Les composés phénoliques comprennent la classe des shikimates et la classe des polyacétates (quinones, orcinols et phloroglucinols) selon que les noyaux aromatiques soient synthétisés par la voies des shikimate (phénols, coumarines, lignanes, tanins, ect..) ou par celle de l'acétate et celle des polyacétates (Bobrysheva *et al.*, 2023). En général, les composés phénoliques sont inégalement répartis chez différentes espèces en fonction de la variété, du stade de développement de la plante et de ses organes, de la nature du tissu végétal et de la cellule (Legrand, 2015; Gómez-Guzmán *et al.*, 2018).

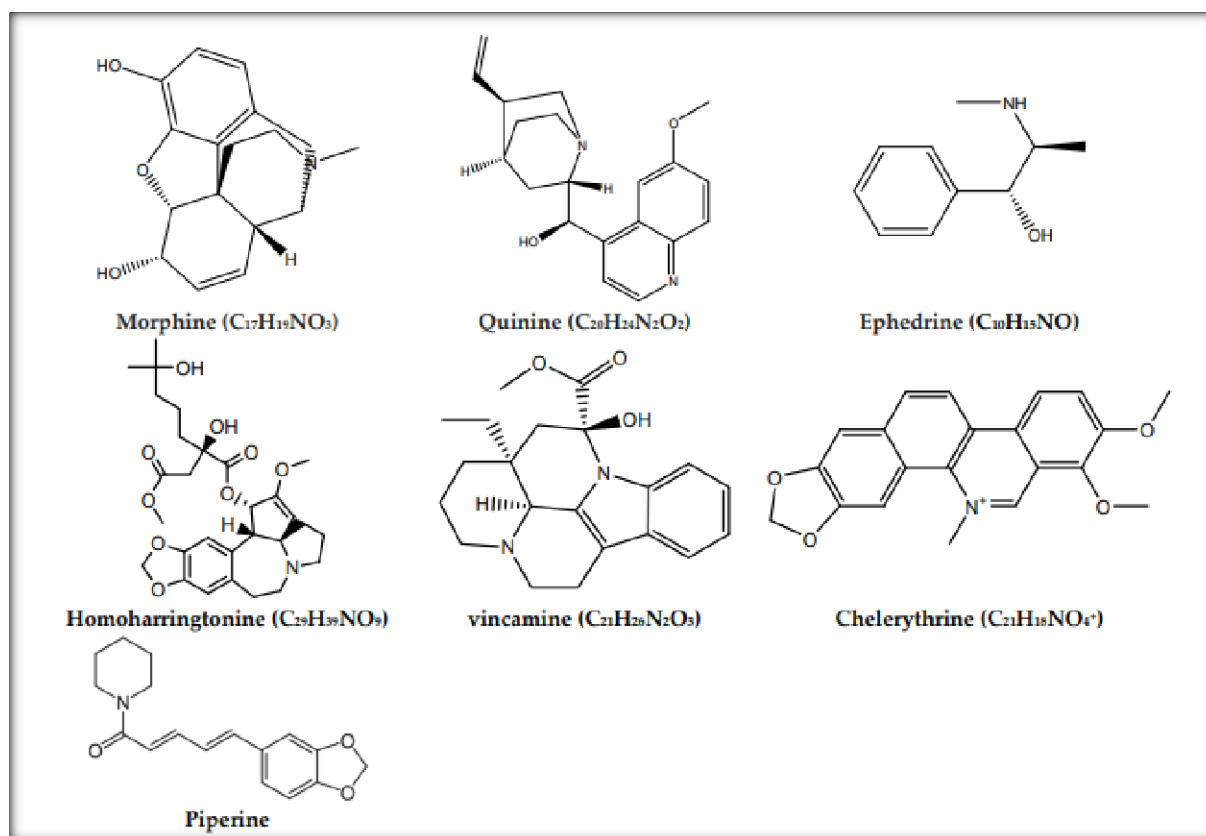


**Figure 31.** Principales classes de polyphénols : flavonoïdes, non flavonoïdes (acides phénoliques, lignanes, stilbènes) et les tanins (Serra *et al.*, 2021).

### I.5.2.3. Composés azotés ou alcaloïdes

Les composés azotés se divisent en deux groupes : les acides aminés et les alcaloïdes.

Les acides aminés n'appartiennent pas aux métabolites secondaires contrairement aux alcaloïdes. Ces derniers sont des composés complexes aux structures les plus variées dont plusieurs sont très toxiques (**Bhat et al., 2005**). Les alcaloïdes sont isolés ou détectés à partir de sources végétales, animales ou microbiennes (**Badiaga, 2012**). Ce sont des substances organiques à caractère alcalin, soluble dans l'eau, et possèdent dans leurs structures au moins un atome d'azote. On distingue trois grandes classes selon qu'elles possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'elles comportent ou non un atome d'azote hétérocycle (**Fig.32**). Les alcaloïdes sont des produits de différentes voies biosynthétiques, principalement à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (**Harborne et Herbert, 1995**)



**Figure 32.** Structures chimiques de quelques alcaloïdes végétaux courants (**Elshafie et al., 2023**)

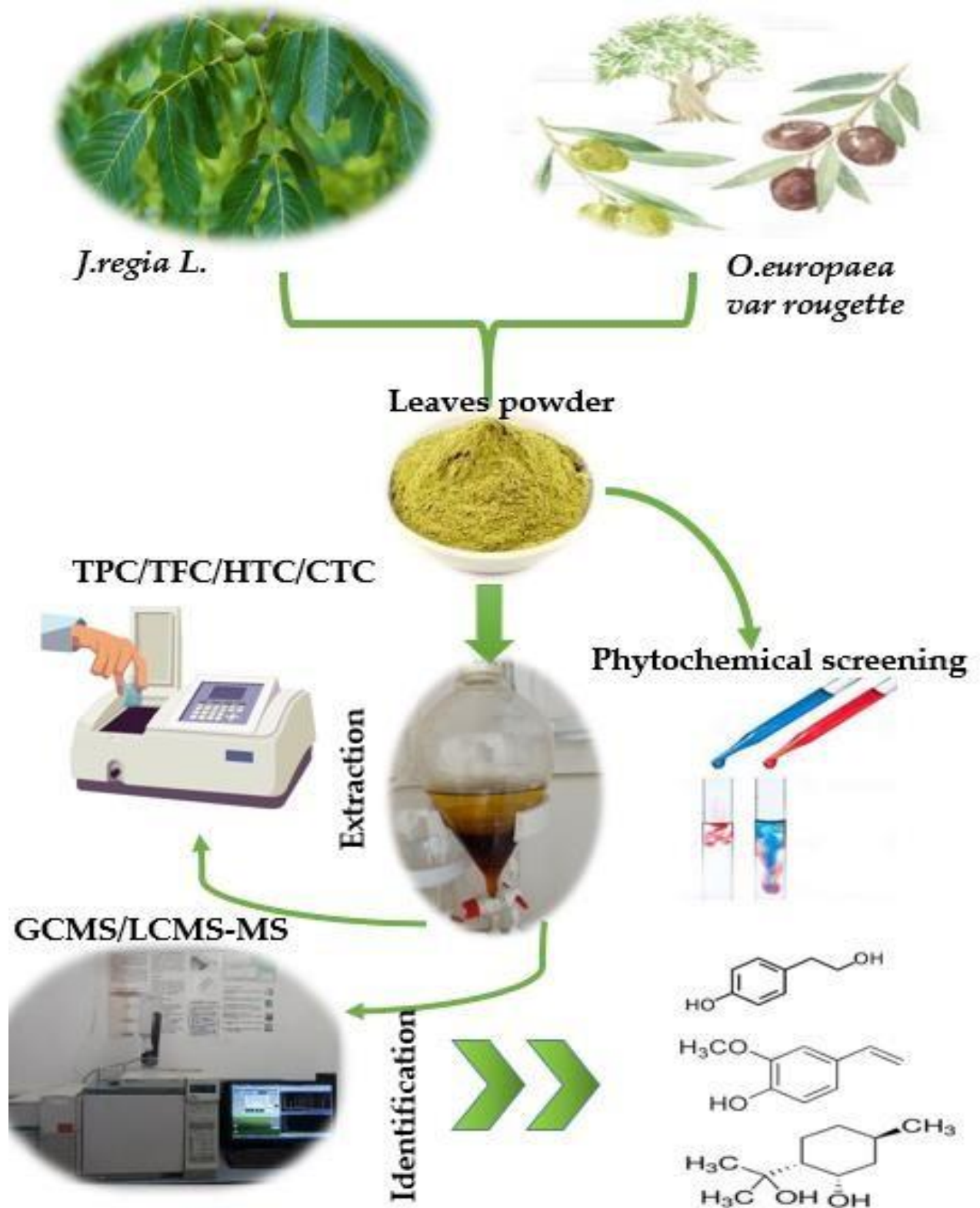
### I.5.3. Rôles des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits dans la nature et remplissent des fonctions de survie pour les organismes qui les produisent. Ces molécules constituent un groupe hétérogène, Certaines fonctions sont interconnectées, tandis que d'autres ne présentent aucun lien entre elles. Les métabolites secondaires servent : d'armes de compétition contre d'autres bactéries, champignons, amibes, plantes, insectes et grands animaux ; d'agents de transport des métaux ; d'agents de symbiose entre les microbes et les plantes, les nématodes, les insectes et les animaux supérieurs ; d'hormones sexuelles ; et d'effecteurs de différenciation (**Demain et Fan, 2000**). Les métabolites secondaires (MSs) des plantes et leurs dérivés ont été utilisés comme agents thérapeutiques pour le traitement de nombreuses maladies depuis l'Antiquité (**Newman et Cragg, 2007**). De nombreux composés naturels d'origine végétale ont été utilisés comme matières premières principales pour plusieurs médicaments. Les MSs végétaux ont également été utilisés comme précurseurs de médicaments, prototypes et sondes pharmacologiques (**Newman et Cragg, 2007; Wilson et Danishefsky, 2007**). Un pourcentage raisonnable de médicaments dans le monde est d'origine végétale, et plusieurs composés bioactifs sont actuellement utilisés dans l'industrie pharmaceutique (**Lahlou, 2007**).

Les MSs végétaux peuvent également être utilisés dans les préparations cosmétiques, cela est principalement due à leur faible toxicité pour les mammifères (**Talal et Fedá, 2003**), Ils sont utilisés pour les soins de la peau, tels que la sécheresse, l'eczéma, l'acné, le piégeage des radicaux libres et d'autres effets de protection de la peau. En outre, ils sont également utilisés comme stimulants de la croissance des cheveux et comme colorants capillaires (**Aikawa, 2002**).

**CHAPITRE II.**  
**EXTRACTION ET ETUDE PHYTOCHIMIQUE**

# GRAPHICAL ABSTRACT



La valorisation des ressources phylogénétiques pour une utilisation durable est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays dont l'Algérie (**Bampouli *et al.*, 2015**), qui par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3.139 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 1,611 sont endémiques et restent très peu exploitées et explorées de point de vue phytochimique (**Sakhraoui *et al.*, 2020**). Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à deux espèces de plantes arboricoles médicinales cultivées : l'olivier et le noyer en provenance de la Mitidja

Cette partie de la thèse porte sur la réalisation d'une étude phytochimique détaillée des feuilles de *Juglans regia* et *Olea europaea* var rougette. Différents types d'extraction ont été réalisés, puis les extraits obtenus ont été analysés qualitativement via CG-SM et LCMS-MS selon la nature chimique de l'extrait. Ces deux techniques permettent d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces, à notre connaissance, la composition chimique de ces deux espèces originaire de la Metidja n'a pas encore été établie.

## **II.1. Matériel et méthodes**

### **II.1.1 Matériel**

Le matériel biologique utilisé dans cette partie concerne les feuilles de noyer commun et d'olivier cultivé récolté à la wilaya de Blida, Algérie.

Le matériel non biologique (équipements, réactifs, produits, consommable...) est représenté dans l'annexe n 1.

### **II.1.2. Méthodes**

#### **II.1.2.1. Échantillonnage**

Les feuilles de l'olivier var rougette ont été obtenues au mois de juin 2018 en récupérant les sous-produits issus de la procédure de la taille dans la région d'Ain-Romana, la commune de Mouzaia, wilaya de Blida. L'échantillonnage des feuilles de noyer a été effectué à la même période de l'année (avant l'apparition des fruits) dans la région Bab Khouikha, la commune de Blida, wilaya de Blida.



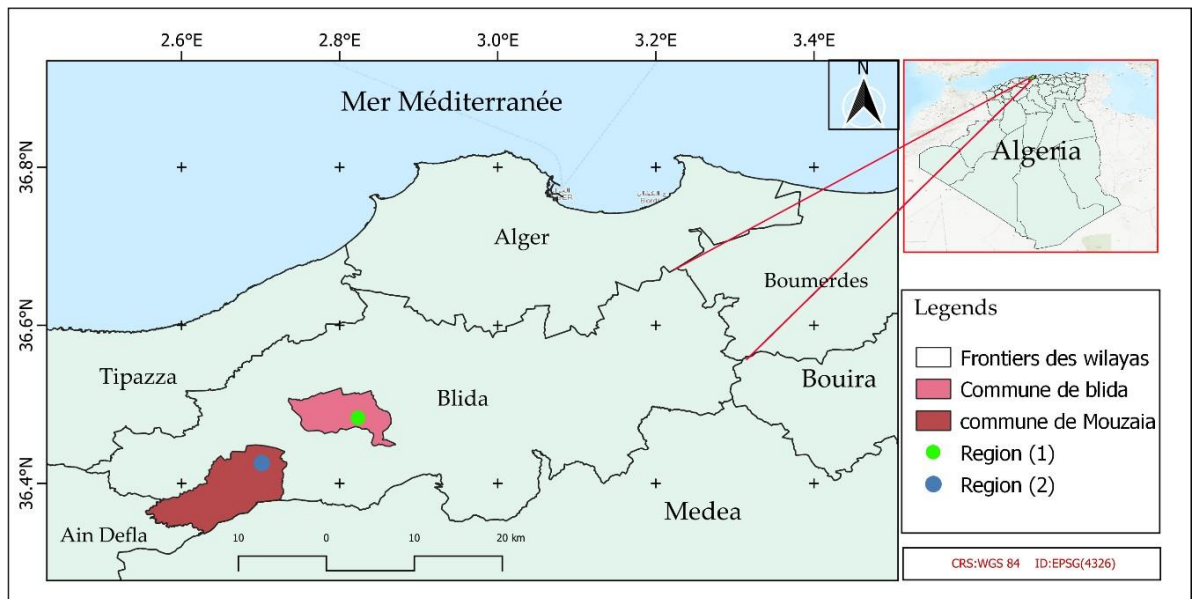
• **Présentation des zones d'étude**

Les données géographiques et bioclimatiques des zones de la récolte des feuilles de noyer et d'olivier sont résumées dans le tableau 4 et la figure 33.

**Tableau 4.** Les données géographiques et bioclimatiques des zones de récolte de feuilles de noyer et d'olivier.

Stations		Latitude (N)	Longitude (E)	Altitude (m)	Température moyenne (°C)	Etage bioclimatique
<b>Blida khouikha)</b>	<b>(bab</b>	36° 29' 00"	2° 50' 00" nord est	229	22°C	Semi aride méditerranéen
<b>Mouzaia romana)</b>	<b>(Ain</b>	36° 25' 15"	2° 42' 42" nord est	297	17°C	Semi aride méditerranéen

(Données de la station météorologique de Dar el Beida pour l'année 2018)



**Figure 33.** Localisation géographique des zones de récoltes.

### II.1.2.2. Traitement préliminaire des feuilles récoltées

Les feuilles fraîchement récoltées ont été séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant une semaine. Une fois séchées, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur maison de marque « Moulinex ». Une farine plus ou moins fine a été obtenue.

Après pesage à l'aide d'une balance analytique 1000 g de poudre de feuilles de noyer et d'olivier ont été obtenus (**Fig.34**). Elles ont été conservées dans des bocaux hermétiques à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure 34.** Feuilles d'*O.europaea* var rougette (A) et *J.regia* L. (B) après réduction en poudre fine.

### II.1.2.3. Analyses physico-chimiques des poudres végétales

#### II.1.2.3.1. Taux d'humidité relative

Le taux d'humidité relative a été effectué selon deux méthodes :

##### ➤ Méthode physique

La détermination de la teneur en eau a été réalisée selon la méthode mentionnée par **Simpson (1999) et Zerrad (2006)**.

Pour déterminer la teneur en eau, deux échantillons de poids déterminé ont été placés dans une étuve à  $75 \pm 2.0^\circ\text{C}$ . Les échantillons ont été pesés chaque 24 heures jusqu'à la stabilisation du poids sec de la matière végétale.

Selon la **Pharmacopée Européenne, (2005)**, le pourcentage du poids d'eau est exprimé par rapport au poids initial selon la formule suivante :

$$HR \% = \frac{(M1 - M2)}{M2} \times 100$$

- HR % : Taux de l'eau en pourcentage.
- M1 : Masse de l'échantillon fraîche en gramme.
- M2 : Masse de l'échantillon après séchage en gramme.

➤ **Méthode chimique (Dosage de la teneur en eau par Karl Fischer)**

Selon la **Pharmacopée européenne (2015)**, la méthode de Karl Fischer est particulièrement adaptée au dosage de l'eau que contient un liquide ou à la détection de traces d'eau, de l'ordre de la ppm, dans un échantillon.

Une prise d'essai de 1g de la poudre végétale a été placée dans l'appareil Karl-Fisher contenant 25ml du méthanol, l'ensemble a été dosé par l'Hydranal composite à 5N.

Le résultat est représenté sous forme d'un pourcentage (%) de l'eau que contient la poudre examiné.

### II.1.2.3.2. Taux des matières organiques et inorganiques

Cet essai est généralement destiné au dosage global des cations étrangers présents dans les substances organiques, et dans les substances inorganiques qui se volatilisent (**Pharmacopée Européenne, 2015**).

Pour obtenir le taux de la matière inorganique ou minérale (**cendre sulfurique**), une prise d'essai de 1,0 g a été effectuée et déposée dans un creuset en porcelaine à laquelle est rajouté 1 ml d'acide sulfurique. Le mélange obtenu a été déposé sur une plaque chauffante jusqu'à évaporation totale de l'acide. Le résidu résultant est calciné dans un four à moufle pendant une heure à 600±5.0°C.

Pour le taux de la matière organiques, une prise d'essai de 1,0 g est déposée dans un creuset en porcelaine, le tout est placé dans un four à moufle à 600±5.0°C pendant une heure.

Le taux des deux fractions organique et inorganiques est calculé selon la formule suivante :

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

Soit : M1 ; Le poids du creuset vide en gramme, M<sub>2</sub> ; Le poids du creuset après calcination en gramme, Pe : La prise d'essai de l'échantillon en gramme.

#### II.1.2.4. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui permet d'analyser les différents composés chimiques présents dans une matière végétale (**Bruneton, 1999**).

Afin de déterminer la présence de divers substances bioactives (métabolites secondaires) tel que les tanins totaux, tanins galliques, tanins condensés, les anthocyanines, les saponines, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les mucilages et les glycosides existants dans les feuilles des deux espèces *Juglans regia* et *Olea europaea* var rougette ; nous avons fait appel aux tests phytochimiques, en utilisant la poudre ou l'infusé à 5% selon la méthode décrite par **Bruneton (1999)**. Cette dernière consiste à mettre en infusion 5 g de poudre de feuilles des deux plantes dans 100 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 à 30 minutes. Le mélange obtenu a été filtré et le filtrat recueilli a été ajusté à 100ml d'eau distillé.

Les changements de couleur ou la formation de précipités sont considérés comme indicateurs d'une réponse positive à ces tests (Tableau n° 5).

Tableau 5. Différents tests du screening phytochimique.

Classe	Métabolites	Mode opératoire	Résultats (coloration)
Composés phénoliques	Tanins	A 5 ml d'infusé, quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> à 5% sont ajoutés	Bleuâtre ou bleue noir
	Tannins galliques	A 5ml d'infusé 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> sont rajoutés	Bleu foncé
	Tannins condensés	A 15 ml d'infusé, sont additionnés à 7ml de réactif de Stinasy	Rouge
	flavonoïdes	Additionner a 5 ml d'infusé 5 ml d'HCl, un coupeau de Mg et 1 ml d'alcool isoamylique	Rouge orangé
	anthocyanes	Rajouter quelques gouttes d'HCl à 5 ml de l'infusé	Rouge
	Leuco-anthocyanes	Une pesée de 2 g de poudre végétale est additionnée dans 20 ml d'un mélange de Propanol/ Acide chlorhydrique (V/V). Le mélange est porté en Bain-Marie bouillant pendant 15 min	Rouge
	Quinones libres	Une quantité de 2 g de poudre humectée par 2ml d'HCl 1N, sont mis en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3 heures. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque <sup>1/2</sup>	Rouge
	Quinones combinés	A un volume de 5 ml d'acide sulfurique 2N sont ajoutés à 2g de poudre, le mélange est porter a reflux pendant 2h. La solution extractive est filtrée puis épuisé par 20ml de chloroforme. Le résidu est épuisé par l'ammoniaque <sup>1/2</sup>	Rouge
Coumarines	Faire bouillir a reflux 2 g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min puis filtrer. A 5 ml du filtrat 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10% sont rajoutées.	Formation d'un trouble	
Composés réducteurs	Mucilages	Introduire 1 ml d'infusé dans un tube à essai, ajouter 5ml d'éthanol absolu.	Après 10 min, précipité floconneux
Composés terpéniques	Saponosides	A 2 ml d'infusé quelques gouttes d'acétate de plomb sont rajoutés.	Précipité blanc
Composés azotés	Alcaloïdes	Faire macérer 5g de poudre humectée à l'ammoniaque <sup>1/2</sup> pendant 24 h dans 50 ml d'un mélange éther/chloroforme (3V/V). Le filtrat est épuisé par l'HCl 2N. Des réactions de précipitations sont réalisées sur la solution chlorhydrique.	En présence d'alcaloïde, le réactif de Dragendroff donne un précipité rouge

**II.1.2.5. Les procédures d'extraction****II.1.2.5.1. Extraction par des solvants organique**

Une quantité de 500g du matériel végétal a été macérée en présence d'un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau ; 500/500 ; V/V) pendant 48 heures à température ambiante. Cette procédure a été répétée 4 fois avec renouvellement du solvant. Les filtrats ainsi obtenus ont été rassemblés et concentrés sous pression réduite à 35°C.

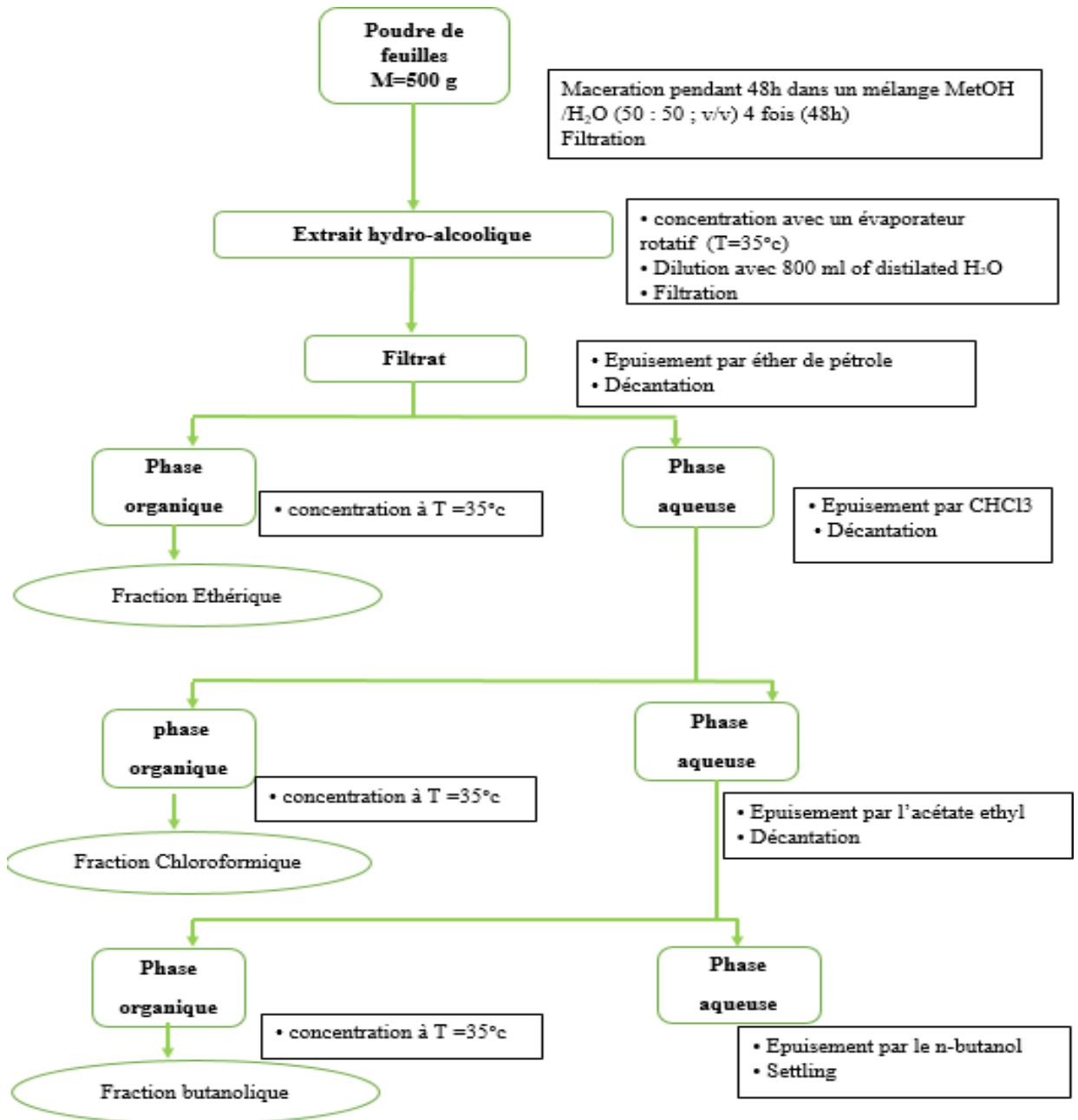
Par la suite une extraction liquide/liquide a été effectué en utilisant des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, chloroforme, acétate éthyle et le n-butanol).

L'extrait brute hydro-méthanolique ainsi que les quatre phases organiques obtenues ont été concentrés sous pression réduite à 35°C .Les rendements d'extraction des différents extraits par les différents solvants sont rapportés dans le tableau suivant.

**Tableau 6.** Rendements des extractions de la poudre des feuilles de deux plantes par les solvants organiques de polarité croissante.

Quantité	plante	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
500 g de feuilles en poudre	<i>Juglans regia</i>	Hydro-methanolique(HMJ)	124	24.8
		Ether de pétrole (EPJ)	6.5	1.3
		Chloroforme (CHJ)	0.5	0.1
		Acétate éthyle (AEJ)	21	4.2
		<i>n</i> -butanol (BTJ)	31.2	6.24
	<i>Olea europeae</i> var rougette	Hydro-methanolique(HMO)	145	29.0
		Ether de pétrole (EPO)	4.3	0.86
		Chloroforme (CHO)	1.0	0.2
		Acétate éthyle (AEO)	15	3.0
		<i>n</i> -butanol (BTO)	32.5	6.50

Le protocole d'extraction adopté est consigné en détails dans l'organigramme ci-après :



**Figure 35.** Organigramme décrivant le protocole d'extraction des poudres de feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette par les solvants à polarité croissante.

**II.1.2.5.2. Extraction des tanins**

Une quantité de 250 g du matériel végétal ont été macérée dans un mélange hydro-acétonique (acétone /eau ; 550 : 990 ; V/V) pendant 96 heures à 4°C, puis filtrer et concentrer sous pression réduite à une température à 35 °C.

La phase aqueuse ainsi obtenue a subit une extraction liquide/liquide en utilisant le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle.

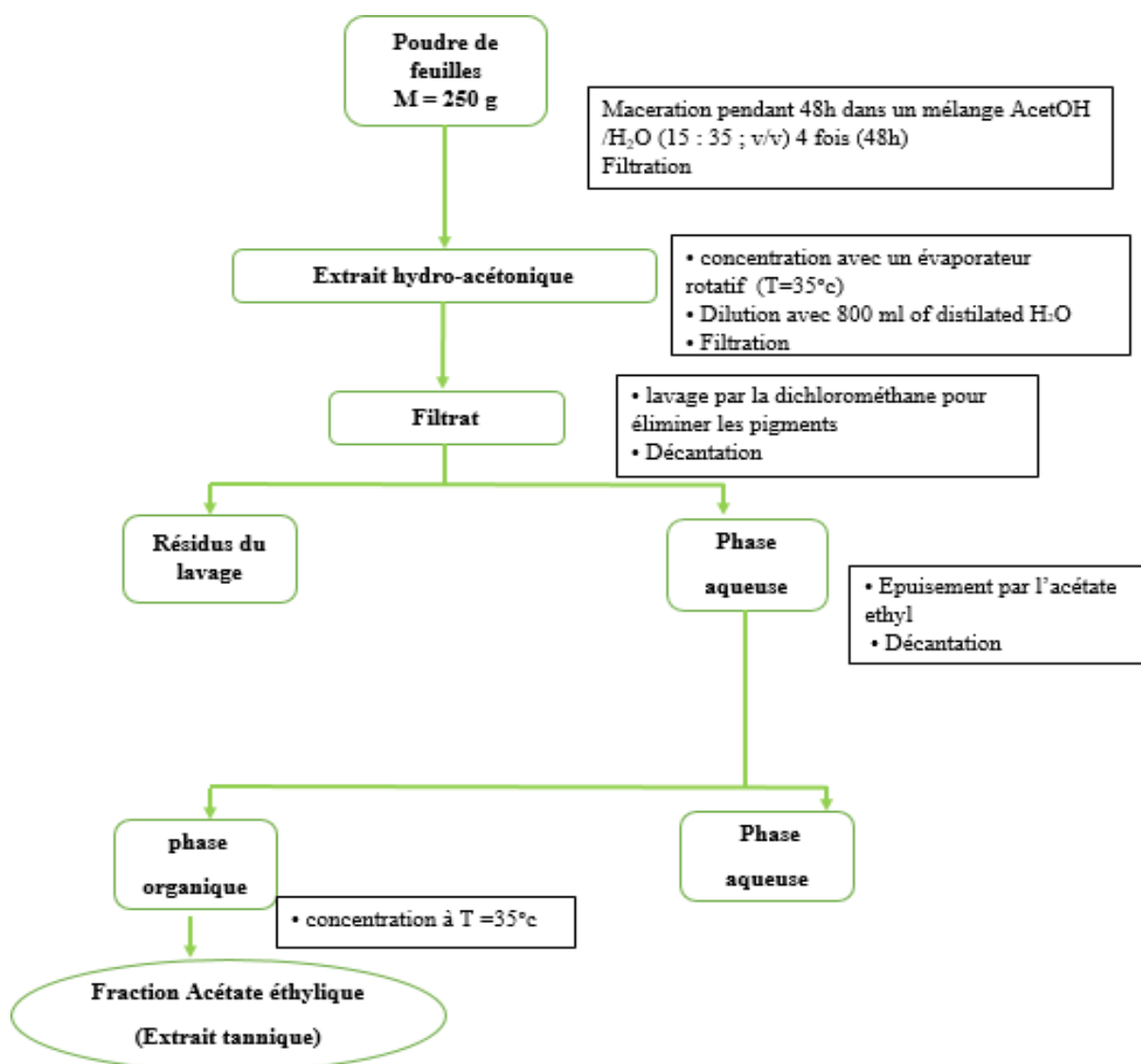
L'extrait brute hydro-acétonique ainsi que la phase organique d'acétate d'éthyle ont été concentrés sous pression réduite à 35°C, les rendements de l'extraction des tanins sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 7.** Rendements des extraits par les solvants organiques de la poudre des feuilles de deux plantes olivier et noyer.

Quantité	Plante	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
250 g de feuilles en poudre	<i>Juglans regia</i>	Extrait hydro-acétonique (ACJ)	15.83	6.33
		Acétate éthyle (extrait tannique) (TNJ)	5.10	2.04
	<i>Olea europeae</i> var <i>rougette</i>	Extrait hydro-acétonique (ACO)	13.00	5.20
		Acétateéthyle-extrait tannique(TNO)	5.75	2.30

Le protocole d'extraction des tannins à partir de feuilles de noyer et d'olivier est repris en détails dans l'organigramme de la figure ci-après.





**Figure 36.** Organigramme décrivant le protocole d'extraction des tanins des poudres de feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette.

## II.1.2.6. Détermination de la teneur en métabolites secondaires

### II.1.2.6.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC)

Les composés poly-phénoliques des extraits de feuilles de noyer et olivier ont été déterminés par le dosage colorimétrique, en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par Vermerris and Nicholson (2006).

Pour cela, 100 µl de chaque extrait ont été mélangé avec 100 µl de Folin Ciocalteu (0.2N) et 2000 µl de carbonate de sodium (7,5 %).

Les tubes à essais ont été agités et conservés pendant 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance a été lue à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (thermo scientific évolution 201 UV/Vis). Une courbe d'étalonnage a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique allant de 20-220 µg/ml.

Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide gallique (µg) par milligramme (mg) d'extrait sec (µg EAG/mg E).

#### II.1.2.6.2. Dosage des flavonoïdes (TFC)

La détermination des flavonoïdes a été effectuée en utilisant la méthode colorimétrique adaptée par **Bahorun et al., (1996)**.

De chaque extrait de feuilles de noyer et d'olivier, on prélève 1 ml qu'on mélange avec 1 ml de la solution de trichlorure d'aluminium (2%). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance a été lue à 430 nm.

Les teneurs des flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercitrine et exprimés en microgramme d'équivalent en quercitrine par milligramme d'extrait sec (µg EQ/mg E).

#### II.1.2.6.3. Dosage des tanins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysables a été déterminée par la méthode de **Willis et Allen (1998)**. De chaque extrait de feuilles de *Juglans regia* et *Olea europaea* var rougette, un volume de 1 ml a été déposé dans un tube à essai contenant au préalable 5 ml d'une solution aqueuse de iodure de potassium (2.5%).

L'absorbance a été mesurée à 550 nm après 4 min d'incubation à une température ambiante. Une gamme de 10 concentrations d'acide tannique (AT) a été préparée à partir d'une solution mère à 2 mg/ml dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide tannique par milligramme d'extrait sec (µg EAT/mg E).

#### II.1.2.6.4. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline décrite par **Hagerman (2002)**.

De chaque extrait de feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette, un volume de 1 ml a été additionné à 2.5 ml de la solution de vanilline (1%) mélangée à 2.5 ml de la solution de l'acide chlorhydrique (8%). Après une minute, une solution d'acide chlorhydrique (5ml) à

4% a été additionnée. Par la suite, le tout a été introduit dans un Bain- Marie pendant 20 min à 30°C.

La lecture des absorbances a été faite à 500 nm. Une courbe d'étalonnage a été établie pour la catéchine dans les mêmes conditions opératoires.

La teneur en tanins condensés est exprimée en microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g EC/mg E}$ ).

#### II.1.2.7. Analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse

La caractérisation des métabolites secondaires a été faite par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS/MS) selon la nature chimique de l'extrait et du solvant d'extraction.

- Les extraits éthériques, chloroformiques, et tanniques ont subi une analyse CG-MS.
- Les extraits acétate d'éthyliques et *n*-butanoliques ont subi une analyse LCMS/MS.

Ces deux analyses ont été effectuées dans le cadre du programme Ibtikar mis en place par la direction générale de la recherche scientifique et technologique (DGRSDT). L'analyse CG-MS a été réalisée dans le centre de recherche de l'analyse physico-chimique CRAPC de Bousmail, Tipaza, Algérie. Par contre, l'analyse LCMS/MS a été réalisée au sein du plateau technique CRAPC de Ouargla, Algérie.

##### II.1.2.7.1. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permet de séparer, d'identifier et de quantifier des analytes au sein de mélanges complexes. C'est une méthode adaptée pour l'analyse de composés de faible poids moléculaire (**Bouchonnet et Libong; 2004**). Pour être analysé en CG-MS, un composé doit être suffisamment volatil et thermiquement stable. En outre, les composés peuvent nécessiter une modification chimique (dérivatisation) avant l'analyse afin d'éliminer les effets d'adsorption indésirables. Les échantillons sont généralement analysés sous forme de solutions organiques, par conséquent, les analytes doivent être extraits de la matrice végétale par des solvants organiques (**Zaiter ; 2017**).

L'analyse par spectrométrie de masse (CG-MS) des extraits éthériques, chloroformiques et tanniques (fractions acétate d'éthyle) a été réalisée par CG-MS (Hewlett Packard Agilent 5973 mass spectromètre).

La colonne capillaire a été imprégnée par des phases stationnaires (5% Phényl et 95% diméthylpolysiloxane),  $30 \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$  df. Équipée d'un détecteur Hewlett Packard Agilent 6890 plus.

L'ionisation a été effectuée par un système d'ionisation d'électrons avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Le gaz Hélium (99,99 %) a été utilisé comme gaz porteur à un débit constant de 1,5 ml/min.

La température de la colonne a été maintenue initialement à 60°C pendant 8,5 min, puis augmentée jusqu'à 250°C au rythme de 2°C/min pendant 10 min en terminant par un maintien isotherme de 5 min à 300°C. Un volume de 1,5  $\mu\text{l}$  d'échantillon a été injecté manuellement en mode splitless. La durée totale de fonctionnement de la GC-MS était de 35 min.

Le teneur relative de chaque constituant de l'extrait a été exprimé en pourcentage avec normalisation de la surface du pic. Chaque constituant a été identifié par ses spectres de masse en comparaison avec la base de données NIST.

#### **II.1.2.7.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse LCMS/MS**

La séparation et la détection des différentes substances phénoliques présentes dans les extraits d'acétate éthyliques et n-butanoliques ont été réalisées à l'aide d'un système HPLC Shimadzu Nexera. Ce dernier est composé de deux pompes LC-30AD, un dégazeur DGU-20A5, un four à colonne CTO-20AC, un injecteur automatique SIL-30AC, un détecteur à barrettes de diodes SPD-M40 (DAD) et d'un spectromètre de masse à triple quadripôle (modèle LCMS-2020) fonctionnant avec une interface d'ionisation par électro-nébulisation (ESI).

Chaque échantillon a été élué à travers une colonne Poroshell 120 EC-C18 ( $4,6 \times 150 \text{ mm}, 4 \text{ }\mu\text{m}$ ) avec une température de colonne de 35°C et un débit de 0,5 mL/min.

##### **➤ Phases mobiles (mode gradient)**

L'objectif des gradients de référence est de déterminer la concentration approximative de solvant nécessaire pour élué le ou les composés d'intérêt de la colonne (Tableau 8).

**Tableau 8.** Mode gradient des phases mobiles pour l'analyse LCMS/MS.

Temps (min)	Phase A (acide formique 0.1%)	Phase B (Acétonitrile)
0-----5	85-65%	15-25%
5-----10	65-75%	25-35%
10-----28	75-40%	35-60%
28-----29	40-85%	60-15%
29----35	00	100%

L'acquisition DAD s'est faite de 190 à 400 nm par pas de 1,2 nm. Le spectromètre de masse était équipé d'une source ESI enregistrée sur un mode d'ionisation (négative et positive) avec des tensions d'interface et de ligne de désolvation (courbe de +4,5 kV et 20 V (CDL), respectivement.

L'azote (N<sub>2</sub>) de haute pureté a été utilisé comme gaz de nébulisation à un débit de 1,5 µL/min. et comme gaz de séchage à un débit de 15 µL/min.

Les températures du chauffe-bloc et du CDL ont été maintenues à 200°C et 250°C, respectivement. Les acquisitions de masse ont été effectuées en mode de balayage complet (100-1000 m/z) et en mode de surveillance sélective des ions (SIM). L'acquisition et les données ont été traitées à l'aide du logiciel Lab Solutions LC-MS Shimadzu 8040.

Les échantillons ont été soumis à un balayage MS pour l'identification des composés. Les principaux composés phénoliques des échantillons ont été identifiés en comparant leur temps de rétention, leur profil UV et les spectres de masse des pics inconnus avec ceux des normes authentiques ou avec les données de la littérature (**Achoub, 2018**)

#### II.1.2.8. Analyse statistique

Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes avec l'erreur standard (M±ES). L'analyse de la variance (ANOVA unidirectionnelle), suivie du test de Tukey, ont été effectués pour déterminer les différences significatives (p<0,05) entre les moyennes, en utilisant le logiciel IBM SPSS Statistics version 25.0.

## II.2. Résultats

### II.2.1. Analyses physico-chimiques de la poudre des feuilles du noyer et de l'olivier

Les résultats des analyses physicochimiques (taux d'humidité, dosage de l'eau, de la matière minérale et de la matière organique) conduites sur les feuilles de noyer et d'olivier sont résumés dans le tableau ci-dessous

**Tableau 9.** Résultats des paramètres physico-chimiques de la poudre des feuilles des deux plants *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette.

	<i>Juglans regia</i> L.		<i>Olea europaea</i> var rougette		P
	Moyenne	± ES	Moyenne	± ES	
Humidité relative (%)	4,90 <sup>c</sup>	0,34	5,56 <sup>b</sup>	1,02	< 0,01
Dosage de l'eau (par karl-fischer) (%)	5,88 <sup>b</sup>	0,43	6,23 <sup>b</sup>	0,35	< 0,01
Matière organique (%)	25,34 <sup>a</sup>	0,21	18,23 <sup>a</sup>	0,02	< 0,01
Matière inorganique (%)	11,26 <sup>a</sup>	0,14	6,95 <sup>b</sup>	0,23	< 0,05

ES: Erreur standard. a-b: des lettres différentes indiquent les différences entre les moyennes d'une même ligne selon le test de Tukey à P < 0,05.

Le teneur en eau a été estimé par deux méthode, une méthode physique (perte a la dessiccation) et par une méthode chimique (dosage de la teneur en eau par Karl-fischer), ce paramètre permettra de contrôler la performance des opérations de conservation et du séchage qui influencent directement la qualité d'un produit (**Pharmacopée européen, 2010**).

Nous constatons d'après le tableau ci-dessus que le taux d'humidité relative des poudres séchées des feuilles de noyer et d'olivier est à 4.90±0.34 et 5.56±1.02 respectivement, les résultats obtenus sont conformes aux normes exigées par la **pharmacopée européenne (2008)**, qui sont inférieure à 10% pour les feuilles du noyer et inférieure à 30% dans les cas des feuilles d'olivier.

Les taux de la matière organique et de la matière minérale pour les feuilles de noyer sont égaux à 25.34±0.21%, 11.26±0.14% et pour les feuilles d'olivier sont 18.23±0.02%, 6.95±0.23% respectivement.

## II.2.2. Étude phytochimique

### II.2.2.1. Screening phytochimique

Dans cette section, une évaluation qualitative a été réalisée à travers un criblage phytochimique, permettant ainsi d'identifier les différentes classes de métabolites secondaires présents dans les feuilles des deux plantes cultivées, l'olivier et le noyer. Les résultats complets du criblage phytochimique effectué sur les poudres végétales ainsi que sur l'infusion sont synthétisés dans le tableau présenté ci-dessous.

**Tableau 10.** Tests phytochimiques effectués sur les feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette.

Composé recherché	Réaction positive	<i>J.regia</i> L.	<i>O.europaea</i> var rougette
Tanins totaux	Coloration bleue-noire	+++	+++
Tanins galliques	Coloration bleue-noire	+++	+++
Tanins catéchiques	Coloration rouge	+++	+++
Flavonoïdes	Coloration rouge-orangée	+++	+++
Alcaloïdes	Coloration rouge	+	+
coumarines	Formation d'un trouble	+++	+++
Quinones libres	Coloration rouge	+++	++
Quinones combinés	Coloration rouge	++	+++
Saponosides	Apparition d'un précipité blanc	+++	+++
Mucilage	Formation d'un précipité floconneux	-	-
Anthocyanes	Coloration rouge	-	-
Leuco-anthocyanes	Coloration rouge	++	-

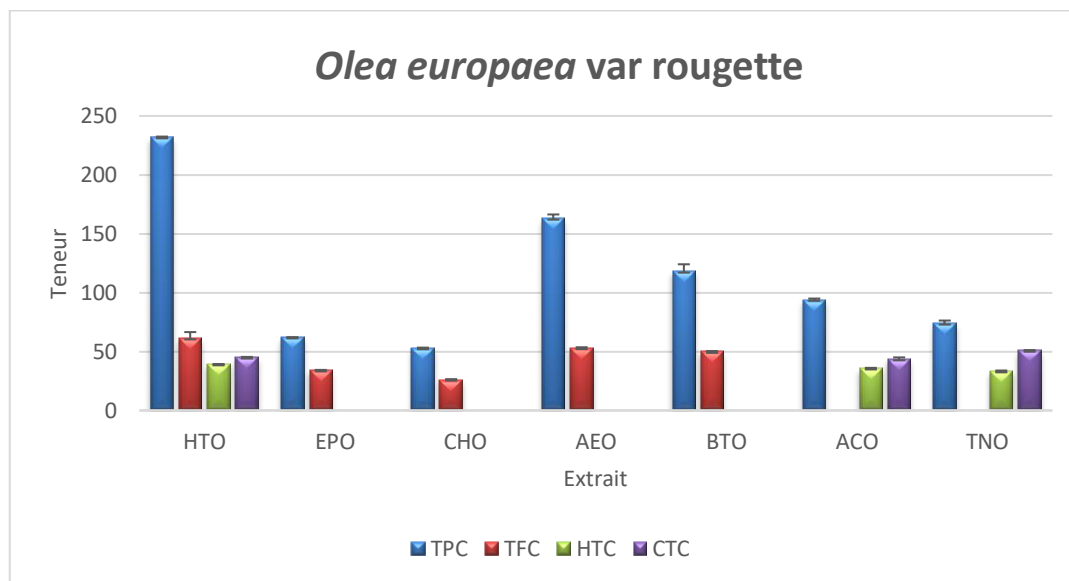
(-) : Absence de la substance recherchée, (+) : Présence en faible quantité, (++) : Présence en quantité moyenne, (+++) : Présence en quantité importante.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence avec une intensité variable de différents métabolites secondaires dans les feuilles sous forme de tanins totaux, tanins galliques, tanins catéchiques, flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres, quinones combinés, saponosides et coumarines. Les leuco-anthocyanes sont présents uniquement chez les feuilles de *J.regia* L. Les feuilles des deux plantes sont dépourvues

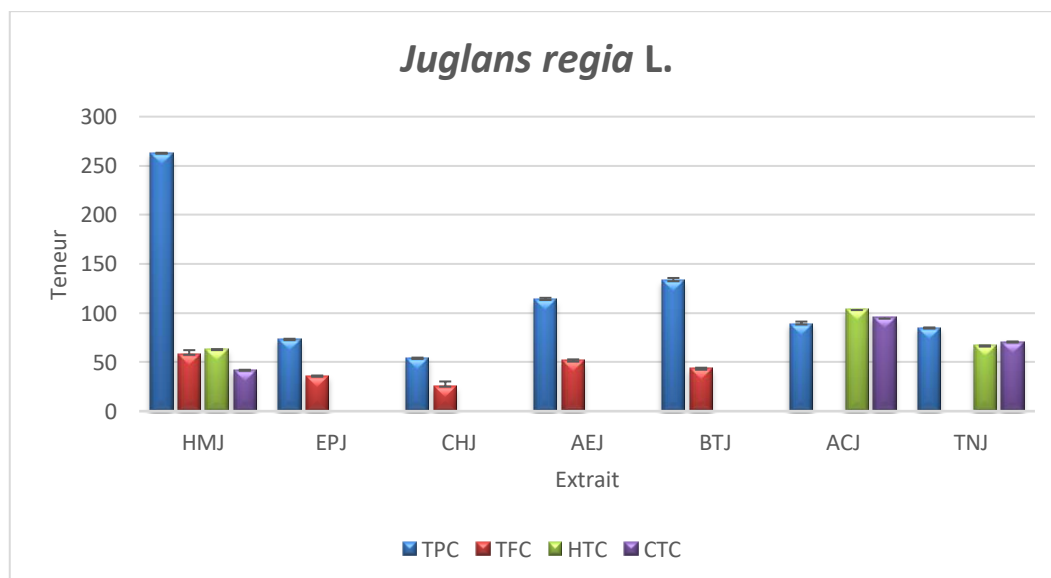
complètement de muçilage et d’anthocyanes. Ainsi, l’intensité de la présence de différentes molécules détectées reste aussi variable d’une plante à une autre.

**II.2.2.2. Dosages spectro-photométriques des métabolites secondaires**

Les résultats obtenus à l’issu du dosage spectro-photométriques des métabolites secondaires tels que les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux et les tanins hydrolysables et condensés au niveau des feuilles d’olivier et de noyer sont reportés sur les figures 37 et 38.



**Figure 37.** Les teneurs des extraits de feuilles d’olivier variété rougette en polyphénols totaux(TPC), flavonoïdes totaux(TFC), tanins hydrolysable(HTC) et tanins condensés (CTC).



**Figure 38.** Les teneurs des extraits de feuilles du noyer commun en polyphénols totaux(TPC), flavonoïdes totaux(TFC), tanins hydrolysable(HTC) et tanins condensés (CTC).



D'après les figures 37, 38 et le tableau 1 en Annexe 1, nous constatons que les polyphénols sont présents chez tous les types d'extraits et fractions, contrairement aux flavonoïdes totaux qui sont présents chez toutes les fractions mis à part l'extrait hydro-acétonique et l'extrait tannique pour les deux plantes.

L'extrait hydro-acétonique et l'extrait tannique des feuilles de deux plantes sont riches en tanins hydrolysables et tanins condensés. Par contre, les extraits hydro-méthanoliques représentent les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux ( $263,22 \pm 0,45$ ,  $232,03 \pm 0,45$   $\mu\text{g}$  EAG/mg extrait pour le noyer et l'olivier respectivement) suivis par les extraits acétate éthyliques et butanolique ( $163,0 \pm 3,39$ ,  $114,26 \pm 2,32$ ,  $133,39 \pm 1,95$ ,  $118,04 \pm 6,04$   $\mu\text{g}$  EAG/mg extrait pour le noyer et l'olivier respectivement).

Par ailleurs, les extraits éther pétroliques et chloroformiques représentent les teneurs les plus faibles en polyphénols totaux avec des valeurs entre 50 et 65  $\mu\text{g}$  EAG/EQ mg extrait.

L'extrait hydro-méthanolique des feuilles d'olivier a enregistré la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux, atteignant  $61,39 \pm 5,1$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait, tandis que l'extrait chloroformique des feuilles de *J.regia* L a présenté la teneur la plus basse, avec  $25,98 \pm 4,30$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait.

Quant à la teneur en tanins hydrolysables et condensés, la teneur la plus élevée a été marquée par les extraits hydro-acétonique des feuilles de deux plantes, contrairement aux autres extraits qui ne présentent aucune trace des tanins hydrolysables et condensés.

### II.2.2.3. Analyses chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse

Les résultats des analyses chromatographiques sont catégorisés en deux types en fonction du solvant d'extraction utilisé. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) a été utilisée pour analyser les fractions issues de l'extrait hydro-méthanolique, notamment la fraction éther de pétrole et la fraction chloroformique. De plus, la fraction acétate éthyle (tannique) obtenue à partir de l'extrait hydro-acétonique a également été soumise à cette méthode d'analyse.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été appliquée aux fractions acétate éthylique et n-butanolique provenant de l'extrait hydro-méthanolique.

➤ **CG-MS**

L'ensemble des résultats de la composition chimique des fractions éther de pétrole, chloroforme et l'extrait tannique des feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette sont représentés dans les tableaux 11, 12 et 13 et les chromatogrammes sont représentés dans les figures 8, 9, 10, 11, 12, 13 en annexe n°4 .

**Tableau 11.** Listes des composés chimiques des extraits étheriques des feuilles de *J.regia* L. et *O. europaea* var rougette identifiés par CGMS-TOF.

<i>J.regia</i> L.					<i>O.europaea</i> var rougette				
Composé	TR (min)	Aire (%)	PM (g/mole)	Formule	Composé	TR (min)	Aire (%)	PM (g/mole)	Formule
2-Methylpentane	5.04	0.28	86.18	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	(S)-pantolactone	3.999	3.09	130.14	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
Methyl benzoate	12.27	0.89	136.15	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2-Propyltetrahydropyran	5.113	23.88	128.21	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>
trans-Pinocarveole	13.46	1.06	152.24	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	γ-nonalactone	5.250	0.47	156.22	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
Verbenol	13.55	0.21	152.24	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	2,5-Dimethyl-1,5-heptadiene-3,4-diol	5.422	9.58	156.22	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
α-Pinocarvone	13.743	0.49	150.22	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	Meparfynol	5.651	1.90	98.14	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O
α-Thujenal	14.407	0.425	153.22	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	Hexanoic acid	6.308	0.74	116.16	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Myrtenal	14.623	1.1697	150.22	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	Phenylethyl Alcool	8.988	1.97	122.6	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O
Tridecane	14.917	0.772	184.37	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	9H-Purin-6-ol	10.594	0.35	136.1115	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O
Eugenol	17.423	46.1729	164.2	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	5-methyl-3-octyne	13.761	0.49	124.125	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub>
Methyl cis-cinnamate	17.79	1.3898	162.2	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	2,3dicyanoquinoxaline	14.184	3.18	160.18	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub>
Hexadecane	18.47	0.6865	226.41	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	Liliolide	14.990	1.30	196.24	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>
α-Farnesene	21.28	5.8722	204.36	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Hydroferulic acid	15.401	3.19	196.20	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Nerolidol	22.503	0.516	222.37	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	Undecanol-5	15.835	1.18	172.3077	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O
α-Bisabolol	22.707	0.3321	222.37	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	α-D-Glucopyranoside, methyl	16.670	19.14	194.18	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	24.763	0.482	278.34	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O	1-(2,4,5-Trihydroxyphenyl)-1-butanone	17.264	2.35	196.2	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Caryophyllene oxide	24.967	0.5362	220.35	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Glucocerucin	17.556	0.98	421.490	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>
Methyl palmitate	25.727	11.1933	270.45	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	3,5-Nonadien-7-yn-2-ol, (E,E)-	17.819	1.43	136.19	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O
linolenelaidic acid methyl ester	27.753	4.0925	294.5	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Hulupone	19.008	0.79	332.434	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub>
Farnesane	31.193	0.2646	212.41	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	6-Chloro-quinazoline-2,4-diol	19.345	0.54	196.59	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Isoeicosane	32.183	0.3368	285.55	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	Acide Ascorbique 4 TMS	28.495	0.68	464.8486	C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub> Si <sub>4</sub>

**Tableau 12.** Liste des composés chimiques des fractions chloroformiques des feuilles de *J.regia* et *O. europaea* var rougette identifiés par CGMS-TOF.

<i>J.regia</i> L.					<i>O.europaea</i> var rougette				
Composé	TR (min)	Aire (%)	PM (g/mole)	Formule	Composé	TR (min)	Aire (%)	PM (g/mol)	Formule
18-Norcholest-17(20),24-dien-21-oic acid, 16-acetoxy-4,8,14-trimethyl-3,11-dioxo-, methyl ester	5.58	25.842	526.7	C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>	Oxalic acid, isobutyl octyl ester	5.08	0.07	258.35	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>
12-O-Tigloylphorbol-13-(2methylbutyrate), Ac derivative	7	0.4439	572	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	Gangaleoidin acetate	9.49	0.064	413.2	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Gangaleoidin" tms derivative	7.95	0.3549	484	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	Pentanedioic acid, (2,4-di-t-butylphenyl) mono-ester	20.10	0.21	320.4	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>
Pentanoic acid	10.45	0.7811	102.13	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	2-Methyldodecane	20.71	0.11	184.36	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	20.09	0.5591	306.4	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Epigallocatechin	22.99	0.07	458.37	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
L-Valine methyl ester	20.85	10.6671	131.17	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Undecane, 3,8-dimethyl	23.333	0.11	184.36	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
Lycophyll	21.03	5.1562	568.9	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	2 methytridecane	23.8	0.09	198.32	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
Plectanixanthin	21.18	0.3324	568.9	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	Phytol	24.8	0.06	296.53	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O
N-(3-Methoxybenzyl)-2-methyl-2-propanamine	22.11	2.3988	193.85	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub>	Hexadecane	27.98	0.36	226.41	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>
3,8-dimethylundecane	23.80	1.0955	184.36	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	Eicosane, 2-methyl	29.09	3.01	296.57	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>
Heptadecane, 9-hexyl-	26.53	0.8354	324.627	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	Octacosane, 2-methyl	30.17	9.93	408.8	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>
Hexadecane	29.09	1.2212	226.41	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	Nonadecane	31.20	18.85	268.51	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>
Phenanthrenequinone, 1,4,8-trihydroxy-2-methyl-3-(4-methylvaleryl)-	29.68	0.3286	368.380	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	Decane, 6-ethyl-2-methyl	31.83	0.08	184.36	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
Heptacosane	30.16	1.3739	380.7	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	Decosane	32.19	21.47	310.6	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
1-iodotetradecane	32.17	0.7193	324.28	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> I	Tetradecane, 1-iodo	33.14	19.29	324.28	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> I
Hexa-t-butylselenatrisiletane	32.39	2.6015	505.9	C <sub>24</sub> H <sub>54</sub> SeSi <sub>3</sub>	Nonane, 1-iodo	33.72	0.36	254.15	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> I
Obscurinervinediol	32.72	31.5914	442.5	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Tridecane, 2,2,4,10,12,12-hexamethyl-7-(3,5,5-trimethylhexyl)	34.04	12.86	394.76	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>
Dodecane	33.12	0.3901	170.33	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	Undecane, 3,8-dimethyl	35.6	3.21	184.36	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
1-iodododecane	34.04	0.5362	296.23	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> I	Undecane, 2,10-dimethyl-	36.8	1.14	184.36	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
Lanosta-7,9(11)-dien-18-oic acid	35.31	2.8155	456.7	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Tridecanol, 2-ethyl-2-methyl	37.99	0.24	242.44	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O

**Tableau 13.** Liste des composés chimiques de l'extrait tannique des feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette identifiés par CGMS-Quadriple.

<i>J.regia</i> L.					<i>O.europaea</i> var rougette				
Composé	TR (min)	Aire (%)	PM (g/mole)	Formule	Composé	TR (min)	Aire (%)	PM (g/mole)	Formula
Phenol (carbolic acid)	4.62	0.19	94.11	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Guaiacol	6.23	0.12	124.14	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Guaiacol	6.24	0.16	124.14	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Catechol	7.8	0.32	110.1	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
Catechol	7.79	0.65	110.1	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Coumaran	8.04	0.37	120.15	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O
Coumaran	8.04	3.94	120.15	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	2-Methoxy-4-vinyl phenol	9.43	1.52	150.18	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
Tetrahydro-4H-pyran-4-ol	9.27	0.27	102.13	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	Syringol	9.93	0.18	154.16	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
2-Methoxy-4vinylphenol	9.43	1.77	150.18	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	P-Tyrosol	11.02	4.70	138.16	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
Eugenol	10.01	0.78	164.2	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Homovanillyl alcohol	12.89	1.32	168.19	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
1-Nitro-3-nhexylbenzene	11.06	0.90	207.27	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	4-Propylresorcinol	13.22	1.07	152.19	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
1-Tridecanol	11.44	0.88	200.37	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O	p-Menth-3-en-9-ol	14.92	0.52	154.25	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
5-hydroxy-1,4 Naphthalenedione(Juglone)	11.96	0.14	204.18	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Palmitic acid	16.77	0.59	256.42	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Homovanillic acid (E)-coniferol)	13.59	0.65	182.17	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Coumarin-3-carboxylic acid	17.03	1.01	190.15	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
1,5-Naphthalenediol(1,5-dihydroxynaphthalene)	14.59	0.66	180.21	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	β-Camphor	17.73	0.17	152.23	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
Tridecanoic acid	15.52	2.01	160.17	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	β-turmerone	21.80	1.57	218.33	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
Gentisic acid, tri-TMS	16.77	1.03	214.38	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	(R)-carvoxime	23.10	2.55	165.23	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO
4-methylthio-4'-(4-nitrocinnamoyl) chalcone	21.86	4.43	370.66	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>3</sub>	Eryvarinol A	24.63	2.56	470.50	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>
	32.40	1.34	429.49	C <sub>25</sub> H <sub>19</sub> [N <sup>+</sup> ]O <sub>3</sub> [O <sup>-</sup> ] S	Isovanillin	27.14	1.00	152.15	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>

\*Note : TR : temps de rétention, Aire : l'air de pic en pourcentage, PM : poids moléculaire

Les composés volatiles des feuilles de *J.regia* L. et *O. europaea* var rougette ont été identifiés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse suite à une comparaison des spectres de masse avec ceux de la base de données NIST2.

L'analyse de la composition phytochimique des fractions flavonoïques et des extraits tanniques des feuilles de deux plantes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a révélé la présence d'une variété de composés. Parmi ceux-ci, on compte les acides gras saturés, les acides gras mono-insaturés et polyinsaturés, les tri-terpènes, les phytostérols, les stéroïdes, les alcanes, les cétones, les lipides phénoliques, les composés alcooliques, ainsi que des tanins et des flavonoïdes.

En tout, 20 phyto-constituants ont été identifiés dans les fractions étheriques et chloroformiques des feuilles de noyer et d'olivier. En revanche, l'extrait tannique des deux plantes a présenté 17 composés bioactifs.

- **LCMS/MS** Les chromatogrammes des fractions butanolique et acétate éthylique ont été représentés dans les figures 14, 15, 16 et 17 en annexe 5 et dans les tableaux ci-dessus.

**Tableau 14.** Liste des composés chimiques de la fraction acétate éthyliques des feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette identifiés par LCMS/MS.

<i>J.regia</i> L.				<i>O.europaea</i> var rougette			
Composé	TR (min)	[MH] <sup>±</sup> (m/z)	Mode de fractionnement	Composé	TR (min)	[MH] <sup>±</sup> (m/z)	Mode de fractionnement
Hydrojuglone derivat 1	0.682	451	355,193	Loganic acid	0.697	374.87	173,127,111, 93, 85
Kaempferol-3-galactoside	0.708	284.40	255, 227,151	Hydroxy-oleuropein	1.057	555.22	537, 393, 323, 291
Procyanidin dimer 1	1.104	425	407,289	Oleuropein	1.065	539.14	377, 307, 275, 223
Trigalloyl-glucose isomer	1.182	295	316,317	Elenolic acid dihexoside	1.466	403.08	371, 241, 223, 179
acid-4-O-β-D-arabinopyranoside	1.404	315	-	Luteolin-O-robinoside	1.696	593.21	447, 431, 285
Kaempferol-3-rhamnoside	1.532	267	285, 447, 284	Demethyl -oleuropein	1.797	525.23	363, 319, 249
Caffeic acid hexoside derivative	1.685	251	317,281,209,251	Oleuropein aglycone	2.108	377.13	345, 307, 275, 241
neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid)	1.794	353	191, 179, 135	Hydroxy-oleuropein derivat	2.370	555	378, 308, 276
dihydroxytetralone hexoside	2.070	339	159, 177, 179	Hydro-Oleuropein	2.516	282	345, 307, 275, 241
Procyanidin dimer 2	2.344	577	425, 407, 289	Oleuropein-O-hexoside	2.811	701	565, 539, 377, 307, 275
Kaempferol pentoside	2.567	284	255,227	(Iso)Nuezhenide	2.813	685	523, 453, 421, 385
Quercetin hexoside derivat	2.776	669	475,415,300	Ligstroside	2.991	523	361, 291, 259, 223
Procyanidin dimer derivat 1	2.790	713	577,425,289	Oleoside	2.995	389.17	345, 227, 209, 183, 165
dihydroxytetralone hexoside	2.953	339	159, 177	Verbascoside	3.394	623.16	461,342,315
Myricetin galloyl hexoside	3.341	631	479	Quercetine	3.446	257	165, 137
ferulic acid hexoside	3.410	355	175, 193, 161	Apigenin-O-dideoxyhexoside-hexoside	4.164	723.23	577, 559, 457, 269
Procyanidin dimer derivat 2	4.085	729	577,425,289	Apigenin-O-dideoxyhexoside-Hexoside derivat	4.166	723.23	577, 559, 457, 269
Imetoxybenzoyl-Dglucopyranoside	9.264	195.5	173	Ethyl gallate	9.247	197.10	169, 151, 125

**Tableau 15.** Liste des composés chimiques de la fraction n-butanolique des feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette identifiés par LCMS/MS.

<i>J.regia</i> L.				<i>O.europaea</i> var rougette			
Composé	TR (min)	[MH] <sup>±</sup> (m/z)	Mode de fractionnement	Composé	TR (min)	[MH] <sup>±</sup> (m/z)	Mode de fractionnement
Myricetin-3-galactoside	0.662	497	316, 317	Secologanoside	0.659	389	345, 227, 209, 183
Kaempferol-3-galactoside	0.808	284.40	255, 227, 151	Oleoside	0.7	393	345, 287, 197
Procyanidin dimer 1	1.112	425	407, 289	Naringenin-hexoside	1.123	433	271
Trigalloyl-glucose isomer	1.163	295	316, 317	Quercetine	1.192	257	165, 137
Hydrojuglone derivative 2	1.490	235	301, 325, 193	Caffeic acid	1.462	181	178, 134
caffeic acid hexoside derivat	1.687	250.25	371, 281, 209, 251	Naringenin	1.527	326	213, 123
Hydrojuglone hexoside derivative	1.791	355	193, 319, 175	Oleuropein aglycon related compound	2.333	338	345, 307, 275, 241
Ellagic acid derivative 2	2.048	485	391, 275, 169	Oleuropein-O-deoxyhexoside	2.756	685.04	539, 377, 307, 275
dihydroxytetralone hexoside	2.058	339	159, 177, 179, 161	Caffeic acid hexoside derivative	2.954	517	341, 371, 281, 209
Procyanidin dimer 2	2.340	577	425, 407, 289	Hydroxytyrosol hexoside	3.391	315.3	153, 287, 196
Kaempferol rhamnoside	2.554	285.6	267, 229, 163	Ferulic acid dihexoside	3.4	375	175, 193, 165
3-p-Coumaroylquinic acid	2.958	337	163, 191, 119, 173	Oleuropeinic acid	4.074	569.12	537, 407, 389
Hydrojuglone dihexoside derivative	2.979	515	477, 173	Apigenin-O-deoxyhexoside-O-glucoside	4.080	579.21	433, 417, 271
Kaempferol-3-glucoside	3.406	255	227, 151	Luteolin	4.382	285.23	257, 151, 133, 107
p-coumaric acid hexoside derivat	3.380	307	307	Luteolin O-hexoside	4.832	447.11	327, 285, 199, 179
(epi)Catechin derivative 1	4.076	407	289, 245	Erythodiol	9.087	443.15	425, 407, 289
5,7-dihydroxy-3,4-dimetoxyflavone	4.833	285	285	Oleoside	9.242	389.0	345, 227, 209, 183

\*Note : TR : temps de rétention, [M-H]<sup>±</sup>, ion pseudo-moléculaire identifié en mode ion négatif et positif.



Les composés non volatiles des feuilles de *J.regia* L. et *O. europaea* var rougette ont été identifiés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse aussi en se référant aux modes de fractionnement des molécules et leurs masses moléculaire.

L'analyse de la composition phytochimique des fractions flavonoïques des feuilles de deux plantes par LCMS/MS a révélé la présence de divers composés tels que : les acides hydrocinnamiques, flavanols, flavonols, kaempferol pentoside, flavones et principalement des naphthoquinones. Au total, 20 phyto-constituants ont été identifiés dans les fractions butanolique et acétate éthylique.

### II.3. Discussion

Au cours de l'histoire, les humains ont constamment eu recours à la nature en tant que fournisseuse de produits naturels, et un nombre remarquable de molécules ont été extraites des plantes (**Cragg et Newman, 2001**). En raison de la présence de constituants biologiquement actifs, les plantes sont largement utilisées pour traiter un large éventail d'affections et de maladies (**Khan et al., 2020**). La flore Méditerranéenne est l'une des plus diverses et des plus abondantes au monde (**Bulitta et al., 2007 ;González-Tejero et al., 2008**). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à faire une extraction ciblé à partir des feuilles de deux plantes arboricoles le noyer et l'olivier, ainsi une caractérisation des différents métabolites secondaires.

A travers l'analyse des rendements d'extraction, il est apparu que les extraits bruts donnaient le meilleur rendement suivi par les extraits flavonoïques et tanniques des deux plantes. Cette variation des rendements est liée à la méthode d'extraction et aux solvants utilisés (**Zang et Hamauru, 2003**).

Les plantes comestibles et non comestibles comprennent des métabolites secondaires, des polyphénols, flavonoïdes et tanins (**Bruneton, 1999**). Certaines substances ont un impact significatif sur les caractéristiques des plantes (**Khan et al. 2022**). Selon **Bruneton, (1999) et Hargman, (2006)**, les solvants optimaux pour l'extraction des tannins sont l'eau, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Par contre les solvants convenables pour l'extraction des flavonoïdes sont l'eau, le méthanol, l'éther de pétrole et le butanol. Les feuilles de *J.regia* et les feuilles de *O.europaea* sont connues pour leurs richesses en substances polyphénoliques, notamment en tanins et flavonoïdes (**Harouak et al., 2021**). Contrairement aux fractions

chloroformiques issues des feuilles de deux plantes, qui contiennent les quantités les plus faibles, les extraits brutes (hydro-méthanolique et hydro-acétonique), les fractions flavonoïques et tanniques ont montré une quantité significative de polyphénols. Les flavonoïdes totaux sont présents uniquement chez l'extrait hydro-méthanolique et ses fractions flavonoïques par contre l'extrait hydro-acétonique et sa fraction tannique ne présentent aucune traces de flavonoïdes. Egalement les tanins condensés et hydrolysables sont présents uniquement chez l'extrait hydro-méthanolique, l'extrait hydro-acétonique et la fraction tannique des feuilles de deux plantes. Cette variabilité est due à plusieurs paramètres, notamment la différence de la nature botanique de l'espèce et la variété de la plante, le climat, le type de sol et la période de l'année où les feuilles ont été récoltées ainsi que la méthode d'extraction (**Top et al. 2017**).

Les extraits bruts et leurs fractions ont montré une quantité considérable de contenus polyphénoliques. Les teneurs en phénols totaux de la totalité des extraits de feuilles de deux plantes sont plus élevées à ceux obtenus par **Oliveira et al. (2008)**, à partir du brou de différentes variétés de *Juglans regia* L. (Franquette  $74,08 \pm 0,02$ , Marbot  $43,77 \pm 0,01$ , Mayette  $41,45 \pm 0,01$ , Parisienne  $38,76 \pm 0,01$  et Mellanaise  $32,61 \pm 0,01$ ), **Pereira et ses collaborateurs (2007)** ont confirmé la richesse des feuilles de *J. regia* L. en composés polyphénoliques. De plus, nos résultats des teneurs phénoliques, flavonoïques et tanniques sont relativement plus élevés que ceux obtenus par **Giura et al., (2019)** sur les feuilles et le brou du noyer commun cultivé en Roumanie.

Les résultats des dosages des polyphénols totaux des feuilles de *O.europaea* var rougette semblent surpasser ceux signalés par **De la Ossa et al. (2019)**, qui ont enregistré une concentration polyphénolique totale de 23,29 mg GAE/kg d'extrait. D'autres études sur les feuilles de *O.europaea* indiquent des taux de tanins et de flavonoïdes moins élevés en comparaison avec nos résultats, comme observé dans les travaux de **Akiyama et al. (2001)**, **Peng et al. (2018)**, et **Borjan et al. (2020)**.

Ces fluctuations dans la teneur des composés bioactifs sont bien documentées, car la distribution des métabolites secondaires est tributaire de l'organe végétal considéré. La composition chimique des phyto-constituants présente des variations liées à des facteurs tels que la localisation géographique, les conditions climatiques, les caractéristiques propres à l'arbre, l'environnement géographique, la nature du sol, ainsi que des facteurs génétiques (**Guptaa et al., 2019**).

Les deux espèces *J.regia* et *O.europaea* sont connues pour leurs richesses en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins (**Jakopič et al., 2009 ; Quirantes-Pinée et al., 2012; Talhaoui et al., 2015, Harouak et al., 2021**).

Les résultats de l'analyse des composés chimiques par CGMS ont conduit à l'identification de 20, 20 et 17 composés chimiques pour la fraction éthériques, chloroformiques et tanniques des deux plantes respectivement. Les composés chimiques appartiennent à cinq groupes majoritaires : les terpènes, les terpenoïdes, les tanins condensés, les acides gras et des phénols. La caractérisation de la composition phytochimique par LCMS/MS a conduit à l'identification de 18 et 17 molécules chimiques pour les extraits acétate éthyliques et n butanoliques des deux plantes respectivement. Ces dernières appartiennent aux différentes classes de métabolites secondaires principalement : les acides hydro-cinnamiques, flavanols, flavones, des tanins hydrolysables et des naphthoquinones.

Les profils chromatographiques des extraits de feuilles d'*O.europaea* var rougette ont révélé la présence de l'oleuropeine, verbacoside, p-tyrosol et apigénine, qui sont des molécules typique à l'olivier. Une similitude de la composition chimique a été observée avec les travaux de **Olmo Garcia et al., (2018)** sur une espèce d'olivier cultivée en Espagne.

Quant à la composition chimique des extraits de feuilles de *J.regia* L. qui sont caractérisées par la présence de juglone (5-hydroxy-1,4 naphthalenedione) et les dérivés de l'hydrojuglone, des molécules signatures de cette espèce ainsi que des acides hydro-cinnamiques, terpéniques, alcools, stérols, phénols....ect. Dans une étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Juglans regia* et de *Juglans nigra* **Paudel et al., (2013)** ont rapporté une composition chimique des feuilles de *J.regia* presque similaire à celle obtenue dans notre études tels que : l'eugénol, le juglone, le guaiacol et l'acide tétradécanoïde. **Sharma et ses collaborateurs (2009)** ont également noté la présence de juglone dans les feuilles de *Juglans regia* cultivées en Inde et dans la région de l'Océan Indien. Dans une autre étude de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de noyer de Tunisie, il a été signalé la présence d'eugénol et l'acide tétradécanoïde ce qui confirme nos résultats (**Bou Abdallah et al., 2016**).

La qualité et la quantité des composés chimiques présents dans les plantes sont influencées par plusieurs facteurs, notamment l'origine géographique, les conditions climatiques, la composition du sol, le patrimoine génétique de la plante, l'organe considéré, le cycle végétatif, la période et la méthode de récolte, ainsi que la procédure et les modalités de

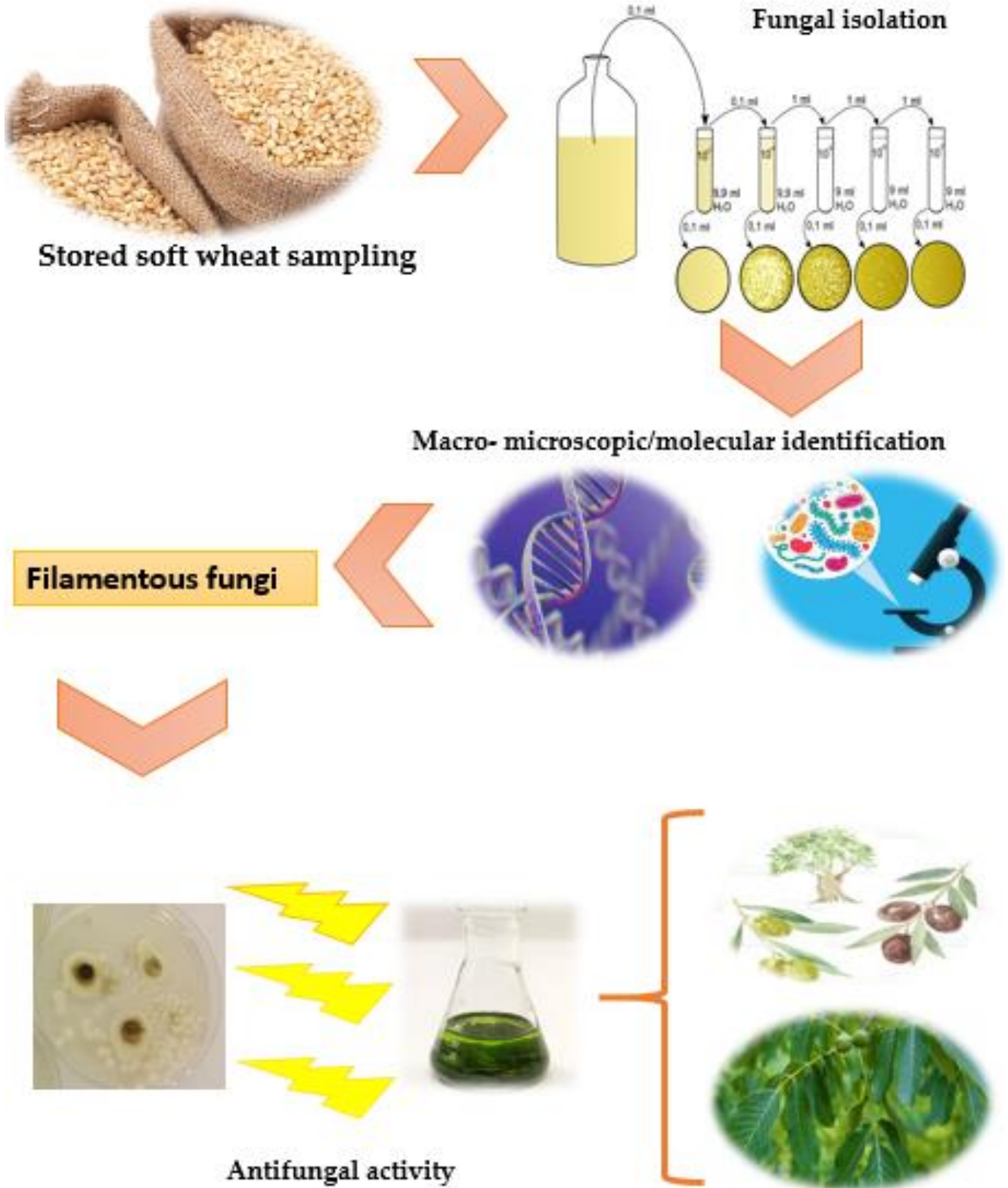
l'extraction, comme souligné par **Deschepper (2017)**. Les plantes sont donc constamment influencées et soumises à des variations environnementales (**Parent *et al.*, 2008**) et en réponse aux conditions environnementales sous et supra optimales, les plantes manifestent également des variations au cours de leurs croissances et de leurs développements (**Yücel et Heybet, 2017**). **Parent *et al.* (2008)**, ajoutent que ces changements peuvent engendrer un stress qui modifie l'hémostasie cellulaire. De même, des études ont montré que la période de la journée, la durée d'ensoleillement et les variations de température, le gel et les précipitations influencent l'activité physiologique et biochimiques des plantes notamment leurs taux métaboliques, leurs structures cellulaires et leurs survies (**Aroun; 2013**).

#### **II.4. Conclusion**

En conclusion, il apparaît que la variabilité de la composition chimique des feuilles de noyer commun et d'olivier étudiées est principalement influencée par les méthodes d'extraction et leurs processus. Le procédé d'extraction choisi s'est avéré être le plus approprié pour obtenir les familles de molécules recherchées, à savoir les tanins, les flavonoïdes (flavonoïdes aglycones, flavonoïdes mono-glycosides et flavonoïdes di-glycosides), ainsi que les acides gras. La diversité phytochimique des molécules extraites peut être exploitée dans de nombreuses applications pour plusieurs domaines (pharmaceutique, médicale, agricole, industriel...) afin de procurer santé et bien-être du citoyen.

**CHAPITRE III.**  
**ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITÉ**  
**ANTIFONGIQUE**

# GRAPHICAL ABSTRACT





## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Les céréales sont confrontées à des défis majeurs liés aux facteurs de stress biotiques et abiotiques pendant la culture, tels que les changements climatiques, mais aussi aux infections causées par de nombreux agents de détériorations (vertébrés, insectes, acariens, moisissures...ect). Ces derniers peuvent en fin de compte dégrader la qualité du produit avant et après la récolte, ainsi que pendant le stockage (**Alkuwari et al., 2022**). La microflore fongique filamenteuse demeure la principale cause d'altération sanitaire des céréales au cours de stockage (**Deligeorgakis et al., 2023**).

La présente partie porte sur l'étude de la qualité physicochimique et mycologique, du blé tendre stocké. Ainsi qu'une évaluation *in vitro* de l'effet des extraits de feuilles d'olivier et du noyer sur la croissance mycélienne et la germination des moisissures les plus dominantes isolées et identifiées du blé tendre stocké.

### III.1. Matériel et Méthodes

#### III.1.1. Matériel

Le matériel biologique utilisé dans cette étude concerne le blé tendre stocké issu de plusieurs régions de l'Algérie et les souches fongique de références fournis par le laboratoire d'hygiène de référence de la wilaya de Blida : *Aspergillus brasilliensis* ATCC 16404 et *Aspergillus carbonarius* M333 (**Fig. 22 en annexe n 9**).

Le matériel non biologique (équipements, réactifs, produits, consommable...) est représenté dans l'annexe n 6.

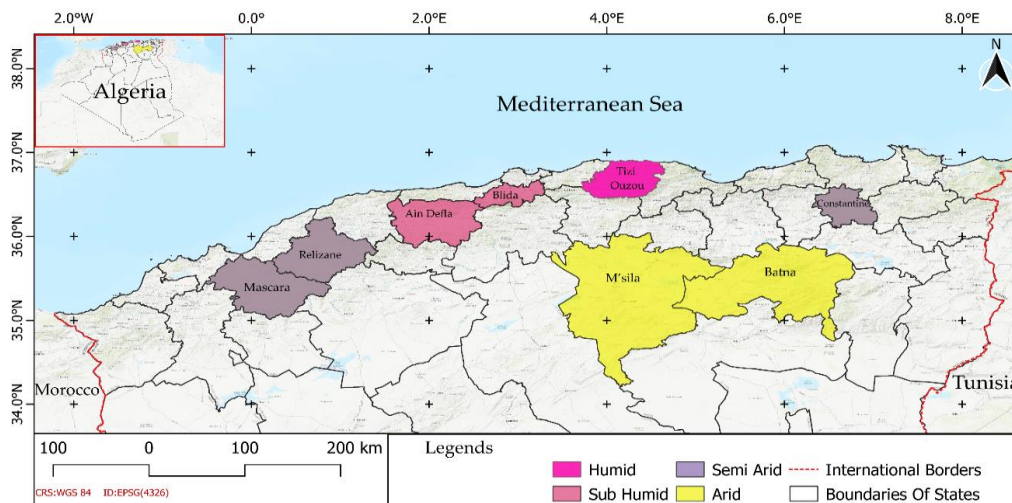
#### III.1.2. Méthodes

##### III.1.2.1. Échantillonnage

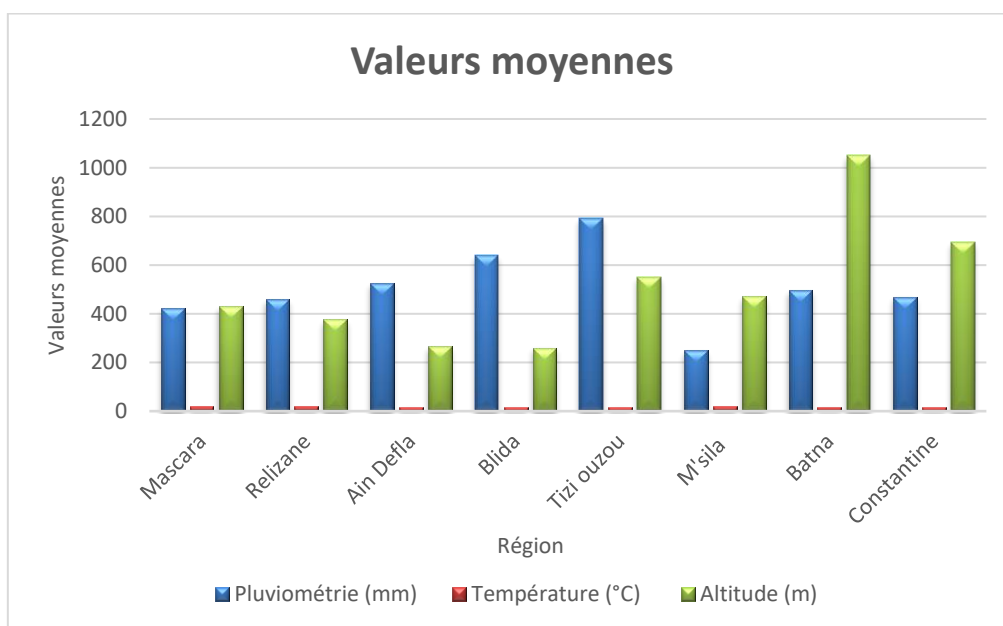
L'échantillonnage du blé tendre (*Triticum aestivum*) a été réalisé au niveau des Coopératives de Céréales et de Légumes secs (CCLS) des régions Centre, Est et Ouest à savoir : wilaya de Blida, Ain Defla, Tizi Ouzou, Relizane, Mascara, M'sila, Batna et Constantine durant l'année 2019-2020. Leurs localisations géographiques et leurs données climatiques sont indiquées dans les figures 39 et 40.



## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE



**Figure 39.** Localisation géographique des zones de prélèvements du blé tendre stocké (Original).



**Figure 40.** Valeurs moyennes des données climatiques (température en °C, pluviométrie en mm et altitude en m) des régions d'échantillonnage du blé tendre stocké durant les années 2019 et 2020 (Köppen et Geiger, 2019-2020).

Les prélèvements ont été effectués par le personnel de l'unité tout en respectant les règles d'hygiène. A cet effet les échantillons ont été collectés avec un matériel stérile (ustensiles de prélèvement) puis introduits dans des sacs stériles. Ces derniers ont été transportés directement au laboratoire dans une glacière (Fig.41).

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE



**Figure 41.** Les échantillons du blé tendre stocké.

Les données mesurées au moment des prélèvements sur les échantillons collectés tels que : les variétés, les quantités prélevées, l'humidité relative et les températures dans les silos et les hangars d'entrepôts sont rapportées dans le tableau 16.

**Tableau 16.** Données sur les échantillons collectés et les conditions lors du stockage.

Région	N° d'échantillon	Variété*	Destination	Quantité (Kg)	Humidité relative (%)	Température (°C)
<b>Blida</b>	02	HD	Semence	01	28	22.5
		ND	Consommation	01	27	23.2
<b>Ain Defla</b>	01	HD	Semence	01	28	24.0
<b>Tizi Ouzou</b>	01	ND	Consommation	01	21	21.4
<b>Relizane</b>	02	HD	Semence	01	22	25.3
		AA	Semence	01	20.5	25.0
<b>Mascara</b>	02	HD	Semence	01	21.4	28.1
		ND	Consommation	01	23	28.0
<b>M'sila</b>	01	ND	Consommation	01	28	24.0
<b>Batna</b>	02	Arz R1	Semence	01	28	24.5
		ND	Consommation	01	20	24.0
<b>Constantine</b>	01	ND	Consommation	01	21	23.0

\*Variété, HD : HD 1200, AA : Ain Abid, ND : non défini.

### III.1.2.2. Caractérisation physico-chimique du blé tendre stocké

#### III.1.2.2.1. Détermination du pourcentage des grains brisés

Les atteintes mécaniques du grain durant le stockage sont favorables au développement des champignons et à l'attaque des insectes. Les grains endommagés deviennent un terrain favorable à l'infestation et à la pénétration des microorganismes, d'où l'importance de leur élimination. Dans chaque échantillon du blé tendre, on calcule le pourcentage des grains endommagés. On comptabilise les grains cassés par rapport à une prise d'essai de 100 graines (Multon, 1982 ; Gacem, 2011).

#### III.1.2.2.2. Détermination de la teneur en eau (humidité)

La détermination de la teneur en eau a été réalisée selon la méthode mentionnée par Simpson et al.,(1999) et Zerrad et al., (2006).

De chaque échantillon une quantité de 5 g a été placée dans une étuve à 75°C. Une prise de poids est réalisée sur l'ensemble des échantillons chaque 24 h jusqu'à la stabilisation de ce dernier.

D'après la Pharmacopée Européenne, (2015), la teneur en eau est exprimée par rapport au poids initial selon la formule suivante :

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

Où :

H% : Taux de l'eau en pourcentage.

M1 : Masse de l'échantillon fraîche en gramme.

M2 : Masse de l'échantillon après séchage en gramme.

#### III.1.2.2.3. Détermination de taux de cendres

La détermination de taux de cendres est indispensable, et a pour but de déterminer la teneur ou la quantité de matière inorganique (matière minérale) contenue dans nos échantillons du blé tendre stocké.

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

La matière minérale constitue un besoin élémentaire, indispensable à la croissance microbienne. Les éléments minéraux sont des précurseurs des activités hydrolytiques des microorganismes et particulièrement les champignons filamenteux. Les microorganismes ont besoin de plusieurs micronutriments (minéraux) qui sont des éléments nécessaires à leur développement et à l'activité de plusieurs enzymes (**Dupin *et al.*, 1992 ; Prescott *et al.*, 2010**).

La teneur en matière minérale est déterminée selon la norme NF V03-720. Elle a été obtenue après incinération de 5g d'échantillon dans un four à moufle de marque HERAUS M110 réglé à  $600 \pm 50^\circ\text{C}$  pendant une heure.

Le pourcentage de la fraction minérale a été calculé selon la formule suivante :

$$C\% = \frac{M_2 - M_1}{Pe} \times 100$$

Où :

C : cendre.  $M_2$  : Le poids du creuset après calcination en gramme.  $M_1$  : Le poids du creuset vide en gramme.  $Pe$  : la prise d'essai de l'échantillon en gramme.

### III.1.2.2.4. Potentiel d'hydrogène (pH) :

Le pH donne la concentration en ions hydronium ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) ou hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ) de manière implicite, cette relation peut être formulée mathématiquement selon **Alexéev.(1980)**, par ;

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-\text{pH}} \quad \text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+] \quad (\log \text{ de base } 10)$$

Une quantité de 5 g de chaque échantillon a été broyée et mélangée avec 100 ml d'eau distillée, puis filtrer à l'aide d'un papier filtre, la solution aqueuse résultante a fait l'objet d'une mesure de pH à une température ambiante de  $25^\circ\text{C}$ .

### III.1.2.3. Caractérisation mycologique du blé tendre stocké

#### III.1.2.3.1. Isolement de la flore fongique

Pour isoler la microflore filamenteuse des échantillons du blé tendre stocké, deux méthodes ont été utilisées ;

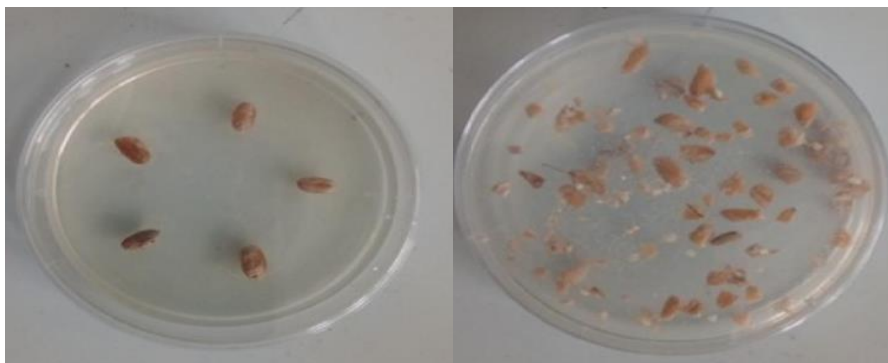
##### ➤ Méthode directe

L'isolement des moisissures à partir des échantillons du blé tendre stocké a été effectué selon la méthode directe proposée par **Champion (1997)**.

Dans un premier temps, les grains de blé sélectionnés au hasard de chaque échantillon ont été placés à l'aide d'une pince stérile dans des boîtes de pétri contenant le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) à raison de cinq grains par boîte.

Dans un second temps, les grains de chaque échantillon du blé ont été d'abord broyés grossièrement puis dispersés directement sur la surface des boîtes de pétri contenant le milieu PDA à l'aide d'une cuillère stérile (**Fig.42**).

Les boîtes ont été incubées à 25°C pendant 4 à 7 jours. Afin d'inhiber la croissance bactérienne, le chloramphénicol (50 mg/ml) a été ajouté au milieu en surfusion. L'opération a été conduite en triplicata.



**Figure 42.** Emplacement des grains de blé tendre entiers et concassés sur le milieu PDA pendant 4 à 7 jours.

##### ➤ Méthode indirecte (ou méthode de dilution)

Pour chaque échantillon de blé tendre stocké, 10g de grains broyés grossièrement ont été additionnés à 40 ml de l'eau physiologique contenant quelques gouttes de Tween 80. À partir de cette solution, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  ont été réalisées puisensemencées sur les boîtes de pétri contenant le milieu PDA chloramphénicolé (50mg/ml). Les boîtes ont été incubées à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , pendant 4 à 7 jours jusqu'à apparition du mycélium. Nous avons retenus

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

trois répétitions pour chaque dilution. Les boîtes témoins ont été ensemencées avec de l'eau physiologique stérile.

Des repiquages successifs ont été effectués dès l'apparition des jeunes thalles de mycélium afin de se débarrasser d'éventuelles contaminations et pour purifier ainsi facilement les isolats. Les cultures pures ont été conservées à 4°C dans des tubes inclinés contenant le milieu PDA chloramphénicolé et par cryoconservation dans un tampon phosphate pH =7.0/Glycérol (70/30%) à -20°C (**Annexe 6**).

### III.1.2.3.2. Identifications des isolats

#### III.1.2.3.2.1. Identification phénotypique

L'identification des genres fongiques repose sur des critères morphologiques et cultureux; par l'observation macroscopique du mycélium, et l'étude microscopique des structures reproductrices (**Chabasse et al., 2002**).

##### ➤ Identification macroscopique

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur le milieu PDA. L'identification se fait à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire, elle se base essentiellement sur les caractères suivants :

- Aspect des colonies : Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien) (**Tabuc, 2007; Chabasse et al., 2002**) ;
- Relief et consistance des colonies : le relief peut être plat ou plissé alors que la consistance des colonies varie de molle, friable, élastique ou dure (**Tabuc, 2007**);
- Taille des colonies : elle varie en fonction des genres fongiques : petites avec une dimension de 3 à 3.5 cm, étendues entre 4 et 5 cm ou envahissantes (**Chabasse et al., 2002**) ;
- Couleur des colonies : c'est un élément très important d'identification ; les couleurs 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

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

niveau du mycélium ou diffuser dans le milieu de culture (**Pitt et Hocking, 1997 ;Chabasse et al., 2002**).

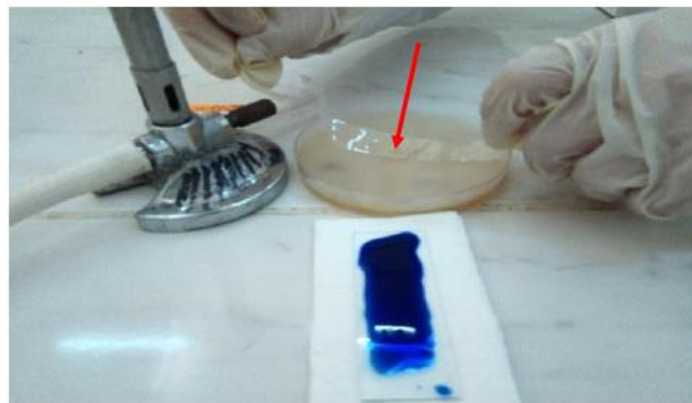
- Structures de fructification : elles peuvent être sexuée ou asexuée et sont des éléments importants de diagnostic (**Botton et al., 1990 ; Tabuc,2007; Lahouar,2016**).

### ➤ Identification microscopique

Ce type d'identification est fondée essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores,..) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes, etc..) (**Botton et al., 1990**). Deux méthodes différentes ont été retenues pour effectuer l'étude phénotypique.

### ➤ Méthode du ruban adhésif (technique du drapeau)

Cette technique consiste à couper un morceau de ruban adhésif de 1,5 cm de long en évitant absolument de laisser ses empreintes sur la face adhésive (**Fig.43**). L'appliquer doucement sur la colonie fongique, le retirer délicatement puis le placer directement sur une lame propre. L'observation se fait sous microscope aux différents grossissements (**Chabasse et al., 2002**).



**Figure 43.** Prélèvement d'une moisissure à l'aide d'une cellophane adhésive.

### ➤ Technique de la micro-culture

C'est une technique très utilisée en mycologie, elle a l'avantage de donner une bonne identification car elle facilite l'observation des arrangements spatiaux des conidies sur les



## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

conidiophores. Le principe consiste à cultiver la souche fongique purifiée sur une couche fine de gélose entre lame et lamelle, afin de pouvoir observer la forme de mycélium et de fructification. Les lames portant les cultures sont ensuite placées sur un support (généralement des pipettes Pasteur recourbés à la chaleur en forme de V) dans des boîtes de Pétri tapissées avec du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile et incubées à 25°C pendant 24 heures à 48 heures, après cette durée, les préparations sont observés au microscope au différents grossissement en présence de bleu de méthylène. (**Chabasse *et al.*, 2002**).

### III.1.2.3.2.2. Identification moléculaire des souches

Les isolats obtenus ont fait l'objet d'une identification génotypique. L'identification moléculaire a été réalisée au laboratoire GLS (Gene Life Sciences) à Sidi Bel Abbes (Algérie) et le laboratoire de recherche de l'Institut Universitaire d'Investigation de viandes et produits carnés, Université d'Estrémadure, Espagne, selon le protocole décrit ci-dessous.

#### ➤ Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait selon le protocole décrit par **Lee et Taylor (1990)**. Le mycélium des souches fongiques a été prélevé après 5 jours à 28°C de culture dans un milieu PDB (Bouillon Dextrose Pomme de terre) (**Annexe 8**) à l'obscurité, puis récupéré par centrifugation pendant 15 minutes à 8000 tours/minutes dans une micro-centrifugeuse. Le surnageant est éliminé. Une quantité de 100µl du tampon d'extraction a été ajouté au mycélium ou culot (200mM tris HCL pH 8,5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Le mycélium a été ensuite broyé avec un broyeur conique, et homogénéisé par agitation manuelle pendant une minute puis placé pendant 20 minutes à -20°C. Cette étape est suivie d'un second broyage auquel est additionné préalablement 200µl de tampon d'extraction. Le mycélium a été placé ensuite pendant 30 minutes à 65°C. Un nouveau volume de 150µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 a été ajouté à notre échantillon qui est par la suite incubés à -20°C pendant 10 minutes.

Le mélange a été centrifugé à pleine vitesse à 4°C pendant 20 minutes et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 1,5ml. L'ADN a été précipité par l'ajout de 450µl d'isopropanol glacé. Après 15 minutes à température ambiante, l'ADN a été mis en pelote à pleine vitesse pendant 30 minutes à 4°C (après avoir éliminé le surnageant de centrifugation). La pelote a été lavée deux fois avec de l'éthanol glacé à 70%, ensuite centrifugée pendant 5 minutes à pleine vitesse (après élimination du surnageant de centrifugation). Cette dernière a



## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

été séchée à 65°C pendant 15 minutes à pleine vitesse. L'ADN a été remis en suspension dans 20µl d'eau stérile ultra pure et sa qualité a été ensuite contrôlée sur un gel d'agarose.

### ➤ Amorces de PCR

L'identification des isolats fongiques se fait par séquençage partiel de la transcription du gène de facteur d'élongation (TEF-1 $\alpha$ ) et du gène de la  $\beta$ -tubuline en utilisant, respectivement, les paires d'amorces BT2a/BT2b et EF-1/EF-2 pour certains isolats. En outre, l'identification des autres isolats se fait par séquençage partiel de la région espaceur interne transcrit ITS (ITS1/ITS4) et du gène du facteur d'élongation. Sur le tableau 4 en annexe 7, il a été mentionné chaque isolat et le gène utilisé pour son identification.

### ➤ Déroulement de la PCR

La réaction d'amplification a été effectuée dans une solution réactionnel de 25 µl de volume contenant : 2 µl d'ADN génomique, 5 µl de Tampon de Taq Promega (1X), 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,2 µl dNTPs (0,2 mM), 1 µl de chaque amorce d'ADN (10 µM), 1 unité de Taq ADN polymérase et de H<sub>2</sub>O pure et stérile.

L'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur Bio-Rad C1000 en suivant les conditions ci-après:

- Une dénaturation initiale à 95°C pendant 1 min, suivie de 35 cycles consistant chacun en une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes ;
- Une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes ;
- Une étape d'élongation à 72°C pendant 45 secondes.
- Une étape d'élongation supplémentaire à 72°C pendant 7 min pour boucler le cycle de PCR.

Les fragments amplifiés ont été purifiés à l'aide d'un kit de purification d'ADN (**Fig.19, annexe 6**), puis, séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) à 90V (**Fig 21. annexe 6**). Un marqueur d'ADN d'un poids moléculaire de 1KB a été utilisé comme témoin.

### ➤ Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été réalisée avec l'utilisation du logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 6.0 (2013). Les séquences obtenues ont été comparées à des séquences type strains sur la base de données du logiciel Blast (basic local alignment search tool), du site NCBI (National Centre Biotechnology Information :

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>). Ensuite, l'alignement des séquences a été effectué par le programme clustal W.W et l'arbre phylogénétique est obtenu par la méthode de Neighbor-Joining (NJ). Toutes les séquences ainsi identifiées, ont été déposées sur la base de données nucléotidique internationale NCBI GenBank où un numéro d'accèsion a été attribué à chaque séquence.

### III.1.2.4. Activité antifongique

Cette étude a pour but d'évaluer l'efficacité des extraits des feuilles de noyer commun et d'olivier cultivé vis-à-vis des souches les plus abondantes isolées de blé tendre stocké. L'effet antagoniste a été effectué sur les milieux PDA et SWA (un milieu à base du blé tendre stocké).

Il convient de noter que les concentrations de l'ensemble des extraits retenues pour cette étude sont le résultat de plusieurs tests préliminaires.

- **Préparation des concentrations**

La préparation des concentrations a été faite suite à la dissolution des extraits organiques dans le diméthylsulfoxyde 2% (DMSO 2%) suivie des dilutions successives selon la formule :

$$C1V1 = C2V2$$

C1 : concentration initiale ; V1 : volume initiale ; C2 : concentration finale ; V2 : volume finale.

Les doses résultantes de ces dilutions sont : 10 mg/mL, 5 mg/mL et 1.25 mg/ml.

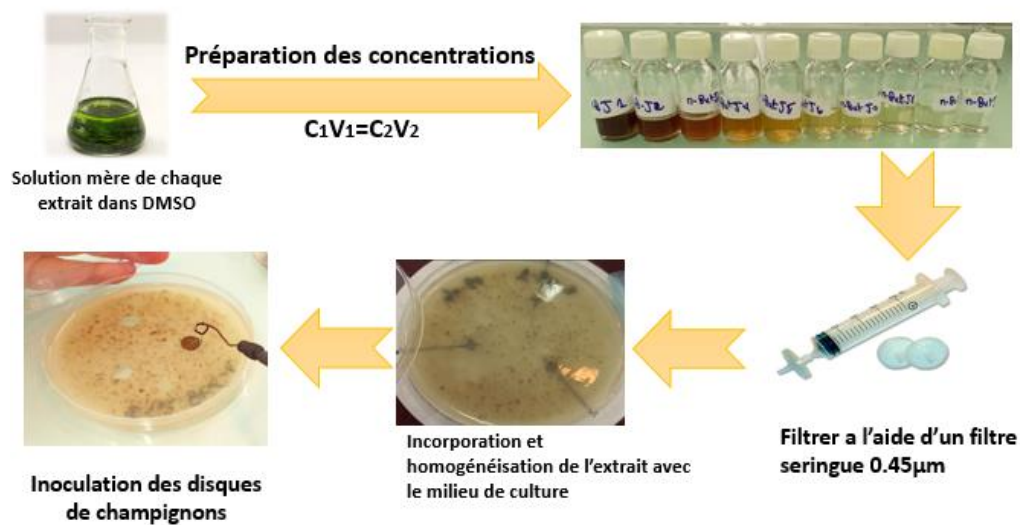
L'activité antifongique des extraits a été déterminée selon la méthode mentionnée par **Dabire et al. (2016)**. Un antifongique commercial, le chlorhydrate de terbinafine (10mg/ml) a été utilisé comme témoin positif par contre le DMSO 2% a servi de contrôle négatif.

#### III.1.2.4.1. Effet sur la croissance mycélienne

Les trois concentrations des extraits ont été incorporées dans le milieu PDA. Trois disques de gélose (6 mm de diamètre) ont été prélevés à partir des cultures jeunes de souches fongiques et placés à égale distance les uns des autres dans la boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours (**Fig.44**).

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

La même opération a été conduite sur le milieu SWA (Da Cruz Cabral *et al*, 2019) avec une activité de l'eau ( $A_w=0.98\pm 0.013$ ) avoisinant celle rencontrée dans le stock de blé.



**Figure 44.** Technique utilisée pour l'évaluation du pouvoir antifongique des extraits de feuilles de Noyer commun et d'Olivier cultivé.

### ➤ Expression des résultats

Les résultats de chaque essai ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de chaque isolat de souche fongique étudiée exposée aux extraits testés. Chaque essai a été réalisé en triplicata.

L'évaluation de l'effet antifongique ainsi que la mesure du diamètre moyen de colonies a été effectuée après chevauchement des colonies témoins. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercés par les extraits ont été calculés selon la formule suivante (Dabire *et al.*, 2016)

$$I\% = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

**I** (%) représente l'inhibition moyenne de la croissance mycélienne, **R1** est le diamètre moyen du champignon en absence de l'extrait. **R2** est le diamètre moyen du champignon en présence de l'extrait.

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

### III.1.2.4.2. Effet des extraits sur la germination des conidies

La germination des conidies constitue une phase importante dans le cycle infectieux des champignons. L'action des extraits de feuilles de noyer et d'olivier a été évaluée sur la germination des spores des isolats fongiques les plus abondants selon la méthode de **Bekkar (2015)**.

A partir des cultures jeunes des isolats, les fragments mycéliens ont été récoltés dans de l'eau distillée stérile. La suspension fongique a été agitée afin de libérer les conidies des conidiophores. Cette dernière a été filtrée à travers un papier filtre stérile afin d'éliminer les fragments mycéliens puis ajustée à  $10^3$  spores/ml (**Chandrakala et al., 2012**).

Une quantité de 0,2 ml de cette suspension a étéensemencée dans le milieu PDB à laquelle l'extrait a été ajouté à part égale (50% v/v). La préparation du lot témoin est réalisée dans les mêmes conditions mais sans addition de l'extrait. Les cultures ont été incubées à  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .

Pour chaque extrait, trois répétitions ont été réalisées. Après 24 h, le comptage des spores, germées ou non, a été effectué sur un total de 150 spores et le pourcentage d'inhibition de la germination des conidies (IG) du champignon a été déterminé en utilisant la formule suivante (**Chandrakala et al., 2012**):

$$IG\% = \frac{N_0 - N_c}{N_0} \times 100$$

IG : inhibition de germination ;  $N_c$  : nombre de conidies germées en présence de l'extrait  $N_0$  : nombre de conidies germées dans le milieu de culture sans extraits.

### III.1.2.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de la version 25 du logiciel SPSS. L'analyse des résultats relatifs aux tests physico-chimiques ont fait l'objet d'une analyse de la variance type ANOVA (LSD,  $P < 5\%$ ). La comparaison des moyennes pour les tests antifongiques a été effectuée par le test de Student (t).

### III.2. Résultats

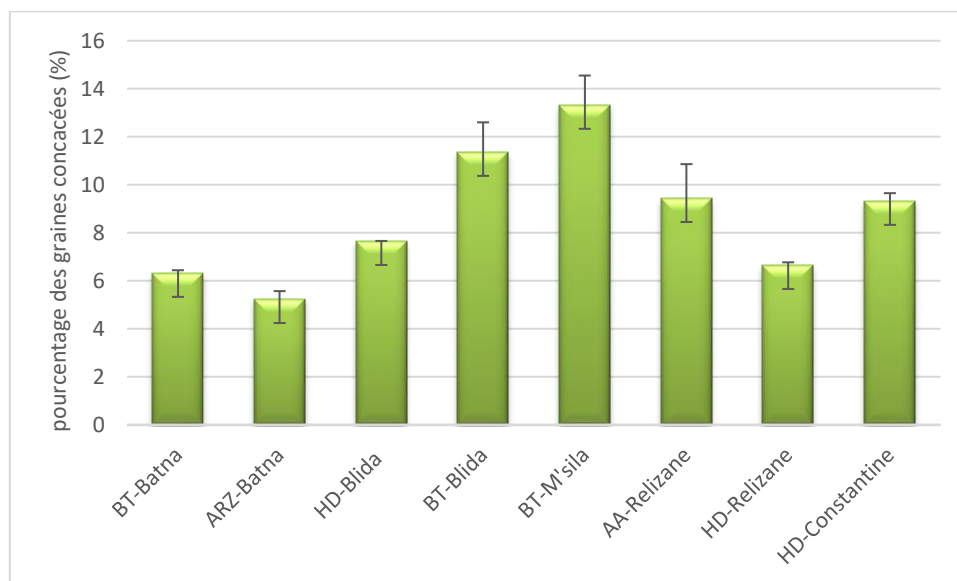
Les résultats des analyses physico-chimiques et mycologiques du blé tendre stocké ont concernées 09 échantillons (Blida, Relizane, Tizi-Ouzou, Constantine, M'sila et Batna). Les échantillons issus des régions de Mascara et Ain Defla ont été éliminés car, ils ont été exposés à un traitement chimique au niveau des CCLS.

#### III.2.1. Analyses physico-chimiques du blé tendre stocké

##### III.2.1.1. Détermination du pourcentage des grains brisés

Une constatation de l'état physique a été effectuée sur les 100 grains prélevés au hasard des différents échantillons de blé tendre stocké.

D'après les résultats affichés sur le tableau 2 en annexe n 5 et la figure 45, les résultats de l'analyse de la variance mettent en évidence la présence d'une différence significative ( $p \leq 0.05$ ) de nombre moyen des grains concassés au sein des différents échantillons, ces dernières ont été rassemblées en plusieurs groupes homogènes.



**Figure 45.** Pourcentage des grains de blé tendre concassé issus de différentes régions.

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

### III.2.1.2. Paramètres physico-chimiques

Les résultats des paramètres physico-chimiques sont rassemblés dans le tableau suivant :

**Tableau 17.** Taux d'humidité relative, pH et cendres des échantillons de blé tendre.

Echantillon	Humidité relative (%) (M±ES)	pH (M±ES)	Cendres(%) (M±ES)
Relizane-HD	11.25±1.12	7.01±0.05	2.01±0.01
Relizane-AA	12.5±0.21	6.90±1.02	1.92±1.01
Blida-HD	12.1±0.13	6.75±0.08	1.32±0.11
Blida-BT	11.67±0.01	6.82±0.04	1.43±0.01
Tizi ouzou-HD	10.39±0.08	7.52±0.33	1.51±2.1
Constantine- BT	10.09±1.3	7.12±0.08	1.44±0.02
M'sila- BT	12.21±0.0	6.32±0.12	1.22±0.32
Batna-Arz R1	9.67±1.01	7.22±0.02	1.76±0.19
Batna- BT	9.98±2.11	7.24±0.01	1.65±1.02

(\*M : moyenne, ES : erreur standard)

Nos échantillons se caractérisent par des taux d'humidité relativement élevés (< aux normes préconisées par Codex stan (199-1995)), nos échantillons analysés ont révélé un pH légèrement acide à neutre (entre  $6.32 \pm 0.12$  et  $7.52 \pm 0.33$ ). Les résultats des taux de cendres des échantillons du blé tendre sont relativement faibles (comprises entre  $1.22 \pm 0.32\%$  à  $2.01 \pm 0.01\%$ ).

### III.2.2. Etude mycologique

#### III.2.2.1. Distribution et abondance relative des champignons isolés

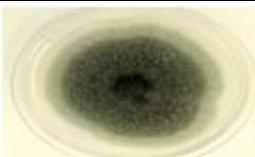












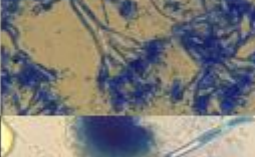


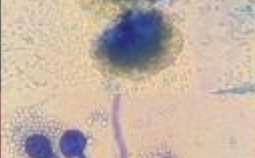




Les identifications macro et microscopique des souches fongiques isolées du blé tendre stocké nous ont permis de recenser 282 isolats appartenant aux genres suivants : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium* et *Ulocladium* (**Tableau 18**).

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* représentent les isolats les plus abondants dans tous les sites d'échantillonnage avec une fréquence de 29.78% et 23.05% respectivement. Les fréquences enregistrées par les genres *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium* et *Verticillium* représentent un indice d'abondance de 10.87%, 7.51%, 6.44%, 5.31%, 2.84%, 1.41% et 1.06% respectivement. Tandis que, le genre *Ulocladium* est le

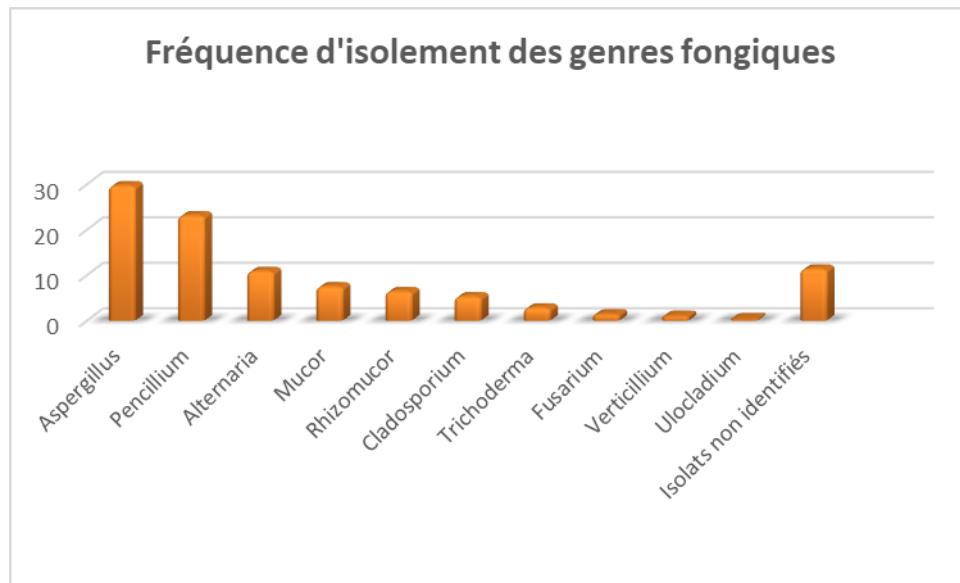
## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

moins isolés avec 0,35% comme fréquence. Les isolats restant dont la fréquence s'évaluant à 11,38% n'ont pas été identifiés microscopiquement vu l'absence de spores et de fructifications. En effet, les observations microscopiques n'ont fait révéler que les hyphes (**Fig.46**).

**Tableau 18.** Souches fongiques isolés des échantillons de blé tendre stocké (**Chabasse et al., 2002 ; Bras et al., 2015**)

Isolats fongiques	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Références
<i>Alternaria sp.</i>			
<i>Fusarium sp.</i>			
<i>Cladosporium sp.</i>			
<i>Verticillium sp.</i>			
<i>Penicillium sp.</i>			
<i>Aspergillus sp.</i>			
<i>Mucor sp.</i>			





**Figure 46.** Fréquences des différents genres fongiques isolés à partir des échantillons du blé tendre stocké.

La comparaison des résultats entre les six régions de prélèvement (Blida, Tizi Ouzou, Constantine, M'sila, Batna, Relizane), révèle la présence de 3 genres en commun, à savoir : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*.

La répartition des genres les plus abondants a fait ressortir des indices qui diffèrent d'une région à une autre. En effet les indices relevés pour le genre *Aspergillus* s'évaluent à 28.11% ,36.24%,17.3%,10.01%, 8.34% et 0% pour respectivement les régions de Relizane, Blida, Constantine, Batna, M'sila et Tizi Ouzou. Alors que pour le genre *Penicillium*, les indices enregistrés sont de 16.36%,6.8%,26.32%, 25.23%,14.06% et 11.23% pour respectivement les régions de Relizane, Blida, Constantine, Batna, M'sila et Tizi Ouzou.

### III.2.2.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des morphotypes au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium*

Les caractérisations macroscopique et microscopique des genres *Aspergillus* (**Fig.47**) et *Penicillium* (**Fig.48**) nous a permis reconnaître trois morphotypes pour chaque genre, révélant ainsi une diversité au sein du même genre.



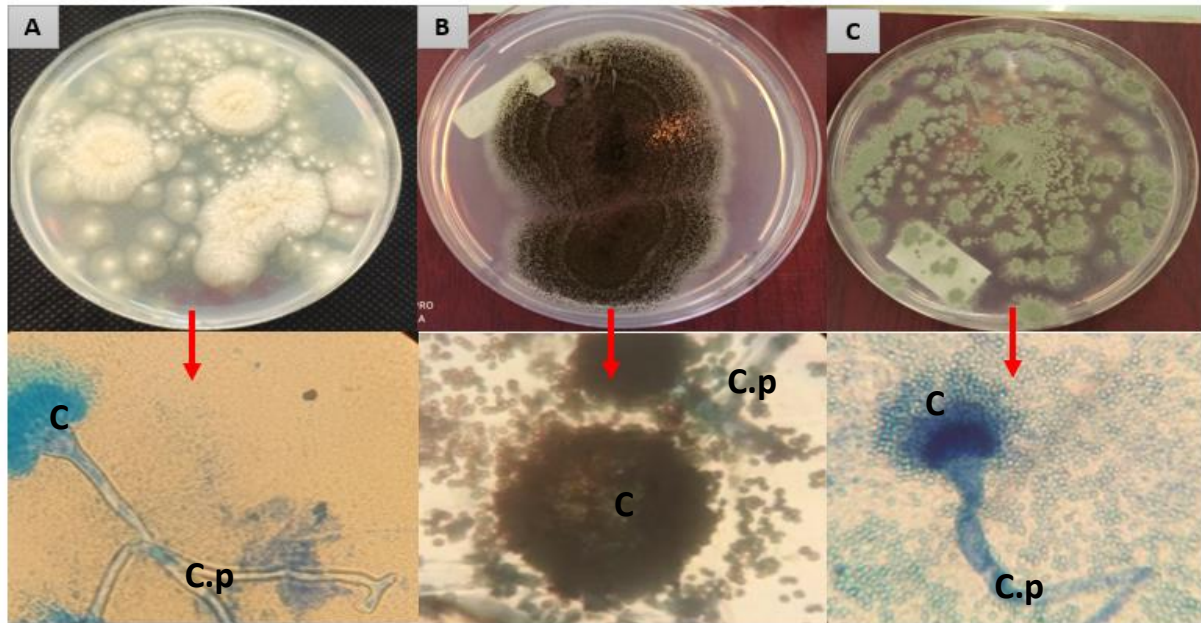
## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

### ➤ Cas du genre *Aspergillus*

-Morphotype I (Asp1) : Les colonies d'*Aspergillus* (Asp 1) poussent de plus en plus lentement, atteignant 4 - 4,5 cm de diamètre en 5 jours, avec une couche de conidies de couleur jaune-crème. Les conidiophores échinulées, avec des vésicules globuleuses et une tête hémisphérique ou cylindrique, de couleur jaune pâle. Les conidies sont globuleuses, à paroi lisse ou rugueuse (**Fig.47 A**).

-Morphotype II (Asp2) : l'isolat appartenant à ce morphotype se caractérise par des colonies qui se développent rapidement, d'abord blanc grisâtre puis vire rapidement vers le noir, ils ont un aspect poudreux. Les colonies sont recouvertes de points de couleur foncée correspondant aux têtes conidiennes. Ces dernières sont grandes, brun foncé, bisériées avec des métules et des phialides brun foncé recouvrant la tête des conidies. Les conidiophores sont longs, à parois lisses et sombres. Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, brun foncé à noires avec des parois rugueuses (**Fig.47 B**).

-Morphotype III (Asp3) : Les colonies d'*Aspergillus* se développent rapidement (48 heures), sont d'abord cotonneuses et prennent rapidement un aspect de poudre fine, bleu verdâtre ou bleu grisâtre. La couleur est bleu-vert ou grisâtre. Au microscope, on observe des têtes colonnaires typiques. Les conidiophores sont courts, à parois lisses et à vésicules terminales coniques portant une seule rangée de phialides (unisériés) dans les deux tiers supérieurs de la vésicule. Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, à parois rugueuses (équinées) et de couleur verte ; elles sont produites en succession basipétale, formant de longues chaînes qui se brisent souvent lors de l'assemblage des préparations (**Fig.47 C**).



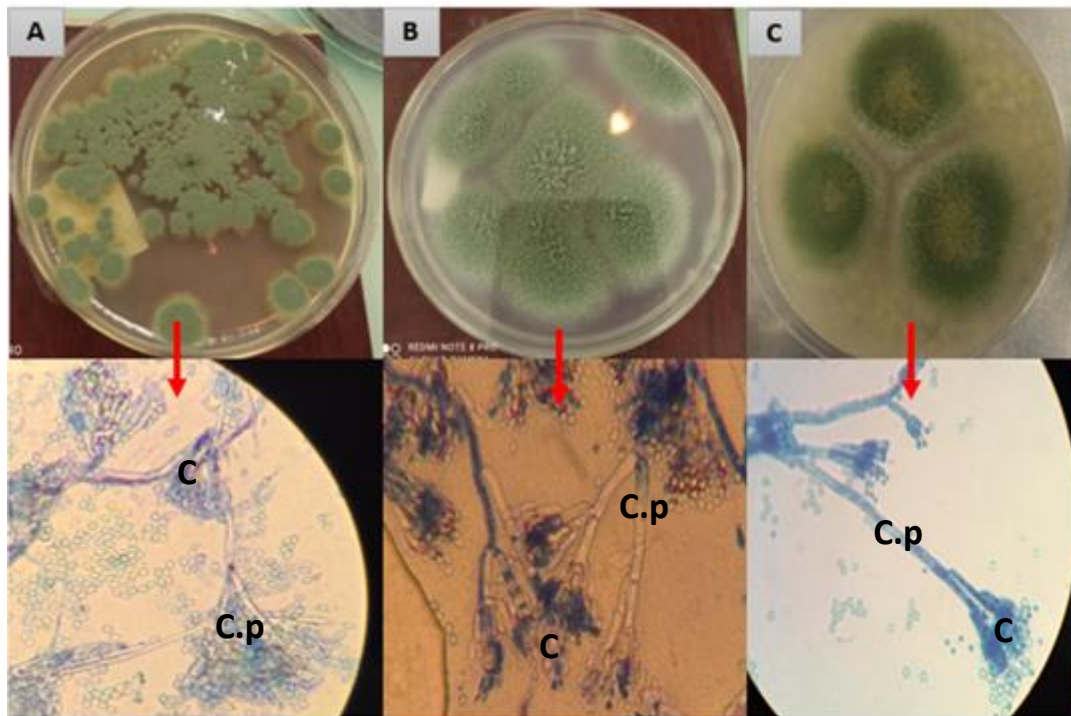
**Figure 47.** Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques souches d'*Aspergillus* spp. (GX100): Asp1(A), Asp2(B) et Asp3(C). (C : conidie, C.p : conidiophore)

➤ **Cas du genre *Penicillium***

-Morphotype I (Pen 1 et Pen 5) : ce morphotype se caractérise par des colonies de couleur vert à contour jaune marron avec une pigmentation jaune à rouge-orangée, leurs aspect est poudreux. Ils se caractérisent par une croissance rapide. Au microscope, les ramifications des conidiophores sont biverticillaires, une faible proportion d'entre elles ayant des ramifications sub-terminales, l'ornementation des conidies est lisse, la forme des conidies est globuleuse à subglobuleuse (**Fig.48 A**).

-Morphotype II (Pen 2 et Pen 4) : les isolats appartenant à ce morphotype présentent des hyphes filamenteux typiques avec des conidies, qui sont les spores asexuées des champignons. Les hyphes sont incolores, minces, tubulaires, ramifiés et septés, ils sont formés de plusieurs fils de mycélium qui peuvent s'entrelacer pour former un réseau hyphalique.

-Morphotype III (Pen3) : Les colonies de cet isolat se caractérisent par une couleur verte et un contour blanc avec une croissance aérienne; les ramifications des conidiophores sont biverticillaires, avec une proportion mineure de branches subterminales. L'ornementation des conidies est lisse avec une forme ellipsoïde (**Fig.48 C**).



**Figure 48.** Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques souches de *Penicillium* spp. (GX100) : Pen 1 et 5 (A), Pen 2 et 4 (B) et Pen 3(C). (C : conidie, C.p : Conidiophore)

### III.2.2.5. Caractérisation moléculaire des souches d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp.

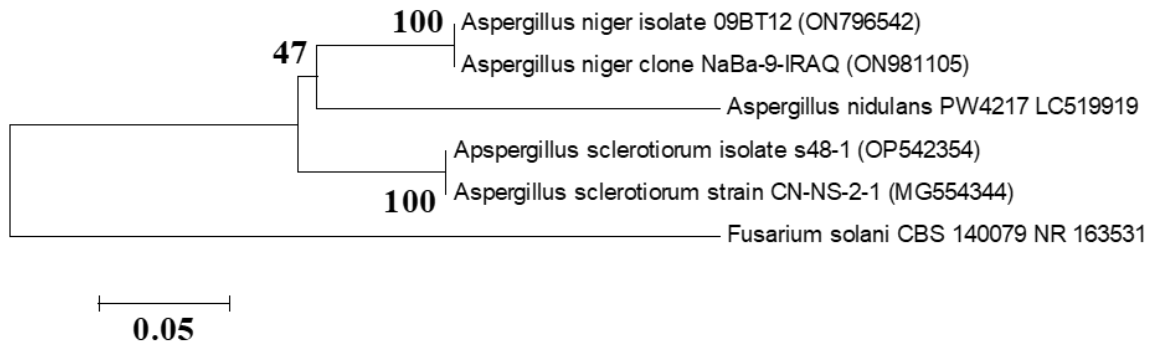
Après une description macroscopique et microscopique détaillée des deux genres les plus abondants dans nos échantillons, ces derniers ont fait l'objet d'une identification moléculaire par séquençage du génome de la région Internal transcribed spacer ITS et le séquençage du génome  $\beta$ -tubuline pour les souches appartenant au genre *Aspergillus* et *Penicillium* respectivement.

Les regroupements des séquences produites avec celles des espèces connues ont permis l'identification des deux souches d'*Aspergillus* spp. et des deux souches de *Penicillium* spp. Leurs séquençage a permis la construction d'un dendrogramme basé sur la méthode de neighbour-joining (Fig.49 et Fig.50).

Les deux souches S48-1(Asp1) et 09BT12(Asp2) appartenant au genre *Aspergillus* spp. ont subi une identification moléculaire par l'amplification de la région ITS qui a donné une bande unique d'environ 600 paires de bases (pb) pour les deux isolats. Le séquençage de la région ITS de l'isolat 09BT12 (ON796542) a montré une grande similarité (100%) avec les séquences de références de *Aspergillus niger* clone NaBa-9-IRAQ (ON981150)(Figure 49). L'isolat S48-1

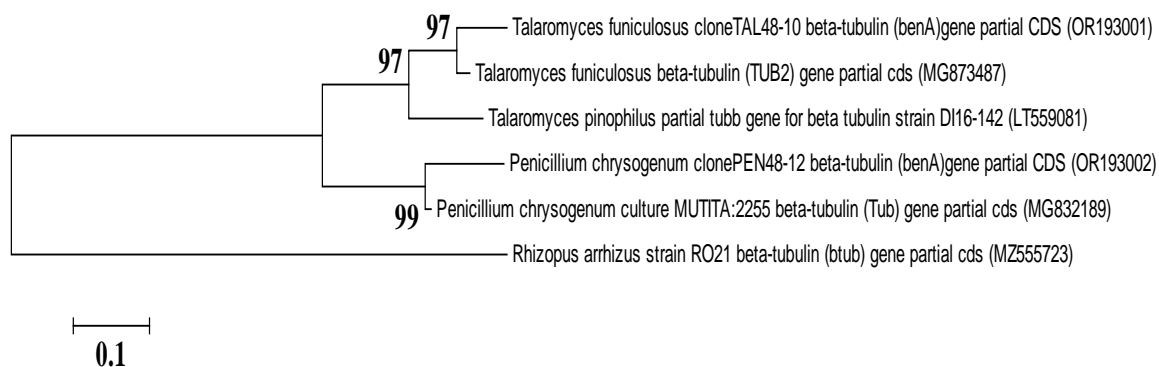
### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

(OP542354) a présenté des séquences ITS avec des pourcentages de similarité respectifs de 100% avec les séquences de référence d'*A. sclerotiorum* CN-NS-2-1(MG554344) (**Fig.49**). En se basant sur l'ensemble des caractères de similarité des séquences ITS par rapport aux isolats de références, nous pouvons constater que les isolats HD09BT12 et S48-1 appartenait à l'espèce de *A.niger* et *A.sclerotiorum* respectivement.



**Figure 49.** Arbre phylogénique basé sur le Maximum-Likelihood généré à partir de l'analyse des séquences ITS. Cet arbre montre la relation entre les souches 09BT12 (ON796542) et S-48-1(OP542354) avec les souches types des espèces appartenant au genre *Aspergillus*.

Les deux souches TAL48-10 (Tal3) et PEN48-12 (Tal2) appartenant au genre *Talaromyces* spp. ont subi une identification moléculaire par l'amplification du gène  $\beta$ -tubuline qui a donné une bande unique d'environ 600 paires de bases (pb) pour les deux isolats. Le séquençage du gène  $\beta$ -tub de l'isolat TAL48-10 (OR193001) a montré une grande similarité (97%) avec les séquences de références de *Talaromyces funiculosus*  $\beta$ -tubulin (TUB2) gene partial cds(MG873487) (Figure 50). L'isolat PEN48-12(OR193002) a présenté des séquences  $\beta$ -tub avec des pourcentages de similarité respectifs de 99% avec les séquences de référence de *P.chrysogenum* culture MUTITA-2255-beta-tubulin (Tub) gene partial csd(MG832189) (**Fig.50**). En se basant sur l'ensemble des caractères de similarité des séquences beta-tubuline gene patial CSD par rapport aux isolats de références, nous pouvons constater que les isolats PEN48-12 et TAL48-10 appartenait à l'espèce de *P.chrysogenum* et *T.funiculosus* respectivement.



**Figure 50.** Arbre phylogénique basé sur le Maximum-Likelihood généré à partir de l’analyse des séquences  $\beta$ -tubuline. Cet arbre montre la relation entre les souches *T.funiculosus* TAL48-10 (OR193001) et *P.chrysogenum* PEN48-10 (OR193002) avec les souches types des espèces appartenant au genre *Penicillium*.

### III.2.3. Activité antifongique

L’activité antifongique a concerné l’étude de l’effet des extraits de feuilles d’olivier et de noyer sur la croissance mycélienne et la germination des différents morphotypes appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

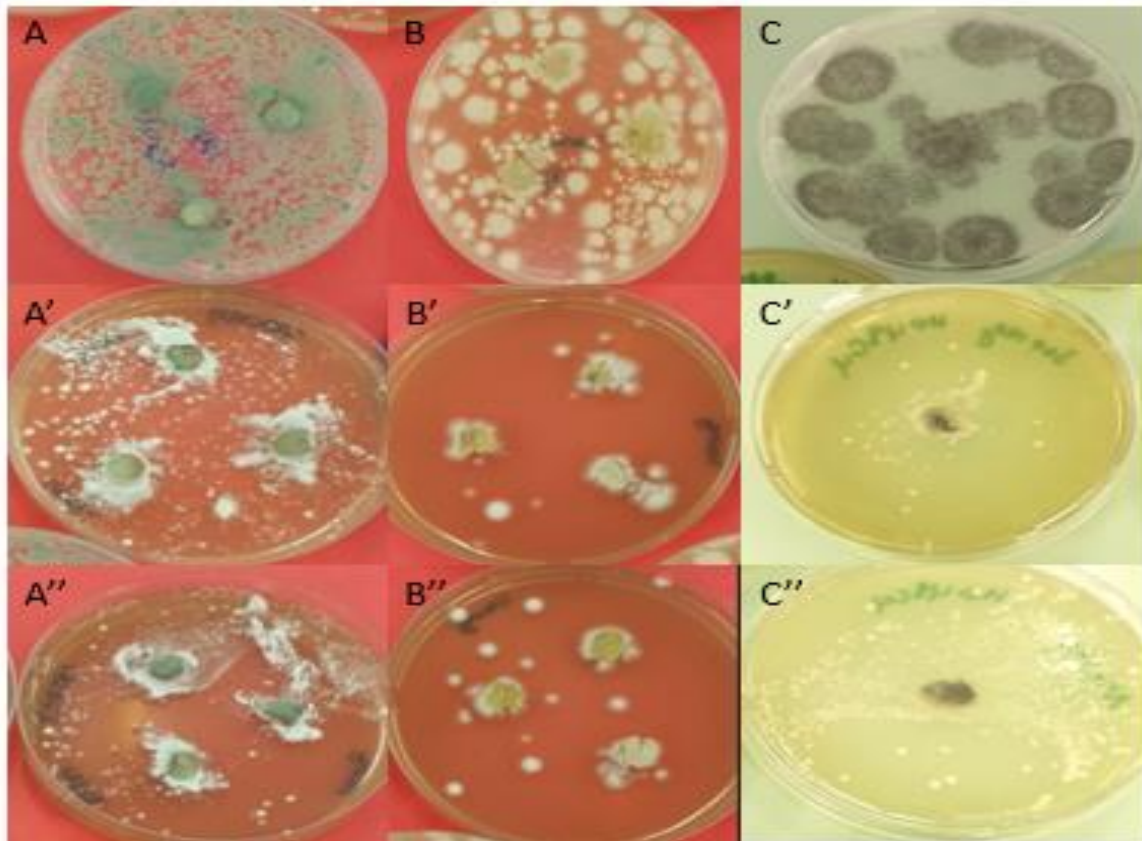
#### III.2.3.1. Effet sur la croissance mycélienne

L’activité antifongique a été testé sur deux types de milieux de culture, un milieu synthétique et un autre milieu semi-naturelle à base de blé tendre stocké avec une activité d’eau  $W_a = 0.98 \pm 0.02$  (similaire au substrat de vie naturelle des champignons isolés).

##### ➤ Cas d’*Aspergillus* spp

Les résultats de l’activité antifongique des extraits de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette à l’égard des isolats fongiques appartenant au genre *Aspergillus* spp. sont présentés dans la figure 51.





**Figure 51.** Effet de l'extrait tannique des feuilles de *J.regia* L. et des feuilles de *O.europaea* var rougette sur la croissance mycélienne des isolats d'*Aspergillus* spp. \*(A,B,C : des souches témoins, A',B',C' : isolats traités par TNJ ; A'', B'', C'' : isolats traités par TNO . Concentration : à 10 mg/ml, température d'incubation : 28°C , durée d'incubation : 7 jours, milieu de culture :PDA )

D'après la figure 51, un faible taux de croissance est enregistré chez les différentes souches testées traitées par les extraits de feuilles de noyer commun et olivier cultivé comparativement aux témoins négatifs.

Le test statistique LSD a montré une différence significative dans l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats du genre *Aspergillus* spp. traités par les extraits tanniques (TNO et TNJ). Le pourcentage d'inhibition de la croissance varie après cinq jours d'incubation en fonction de la nature de l'extrait, de la concentration et des souches testées utilisées. D'après les résultats, l'ensemble des extraits des feuilles de noyer et d'olivier cultivé ont eu un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur toutes les souches. La plus forte inhibition de la croissance a été enregistrée par les extraits tanniques TNO et TNJ avec un taux moyen d'inhibition d'environ 71% (**Fig.51**).

### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

D'après les tableaux 11 et 18 présentés en annexe 10, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne le plus élevé qui a été enregistré était de 72.5% et 74.4 marqué par l'extrait TNJ et TNO à la plus grande concentration (10mg/ml) contre la souche isolée Asp3 respectivement. Tandis que le taux le plus faible enregistré était de 20.3 % marqué par l'extrait BTJ (10mg/ml) contre la même souche(Asp3) après 5 jours d'incubation à 28°C. D'après la figure 51, les extraits TNO et TNJ exercent un effet inhibiteur de la croissance mycélienne plus important sur les isolats et les deux souches de références testés en comparaison avec les autres extraits et le produit chimique de référence chlorhydrate de terbinafine (10m/ml) (**Tableau 19 ; annexe 10**). Sur le milieu SWA, les extraits des feuilles de noyer et d'olivier cultivé ont enregistré des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne très rapprochées que celles calculés pour le milieu PDA.

L'étude statistique par le biais du test de Student (t), dont le but de comparer la différence de l'efficacité des extraits de feuilles testés sur les milieux de culture SWA et PDA a révélée des différences non significatives pour la plupart des extraits testées (**tableaux 19 et 20**).

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

**Tableau 19.** Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de *J.regia* L. sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre *Aspergillus*: comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test).

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne <i>Aspergillus</i> spp.					
Extracts	Concentration (mg/mL)	PDA	SWA	Sig	Significance
HMT	10	38.97±1.41	36.66±1.56	0.048	*
	5	34.94±1.48	31.83±1.68	0.456	n.s
	1,25	27.43±2.40	24.31±3.43	0.321	n.s
EPJ	10	60.55±2.52	59.97±2.12	0.134	n.s
	5	46.07±2.79	49.70±2.40	0.020	**
	1,25	36.48±3.21	42.89±3.92	0.048	*
CHJ	10	38.12±1.01	31.53±1.27	0.117	n.s
	5	27.54±1.39	21.40±1.13	0.018	**
	1,25	15.98±1.31	9.36±2.21	0.007	***
AEJ	10	38.12±1.01	31.53±1.27	0.117	n.s
	5	27.54±1.39	21.41±1.13	0.118	n.s
	1.25	19,02±1.79	14.35±1.80	0.011	**
BTJ	10	36.65±2.45	30.79±2.33	0.043	*
	5	26.59±2.39	22.19±2.21	0.681	n.s
	1.25	18.15±1.21	13.75±2.27	0.520	n.s
ACJ	10	51.01±2.09	45.96±1.77	0.379	n.s
	5	41.12±1.47	36.05±1.86	0.369	n.s
	1.25	30.21±1.98	26.27±2.40	0.325	n.s
TNJ	10	69.91±0.57	64.03±0.93	0.003	***
	5	54.69±0.52	51.43±0.32	0.050	*
	1.25	44.99±0.72	42.21±0.53	0.113	n.s

notes : Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions suivie de l'erreur standard ± , \*\*\*Hautement significatif

, \*\*Moyennement significatif, \*Significatif, n.s. non significatif (p ≥ 0,05).



## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

**Tableau 20.** Evaluation de l'effet des extraits de feuilles *O.europaea* var rougette sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre *Aspergillus*: comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test).

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne <i>Aspergillus</i> spp.					
Extracts	Concentration (mg/mL)	PDA	SWA	Sig	Significance
HMO	10	34.40±0.83	30.32±0.66	0.848	n.s
	5	26.26±0.70	22.05±0.84	0.289	n.s
	1,25	17.57±0.80	09.26±1.34	0.054	n.s
EPO	10	60.95±2.39	59.69±1.78	0.048	*
	5	46.98±2.78	48.73±2.16	0.403	n.s
	1,25	35.51±3.11	37.31±3.35	0.745	n.s
CHO	10	38.37±0.95	31.66±1.12	0.356	n.s
	5	27.60±1.46	21.69±1.12	0.059	n.s
	1,25	16.37±1.05	11.38±1.88	0.052	*
AEO	10	37.04±2.42	32.18±1.90	0.425	n.s
	5	26.63±2.40	22.47±2.14	0.592	n.s
	1.25	18.39±2.27	14.23±2.25	0.860	n.s
BTO	10	37.21±2.51	30.76±2.34	0.071	n.s
	5	26.80±2.43	22.52±2.08	0.476	n.s
	1.25	18.33±1.94	14.18±2.24	0.595	n.s
ACO	10	51.33±2.04	46.15±1.77	0.487	n.s
	5	41.18±1.46	36.19±1.89	0.338	n.s
	1.25	30.21±1.98	26.49±2.44	0.332	n.s
TNO	10	70.61±0.56	64.54±0.93	0.013	***
	5	54.66±0.52	51.48±0.28	0.015	***
	1.25	45.67±0.83	42.21±0.53	0.027	**

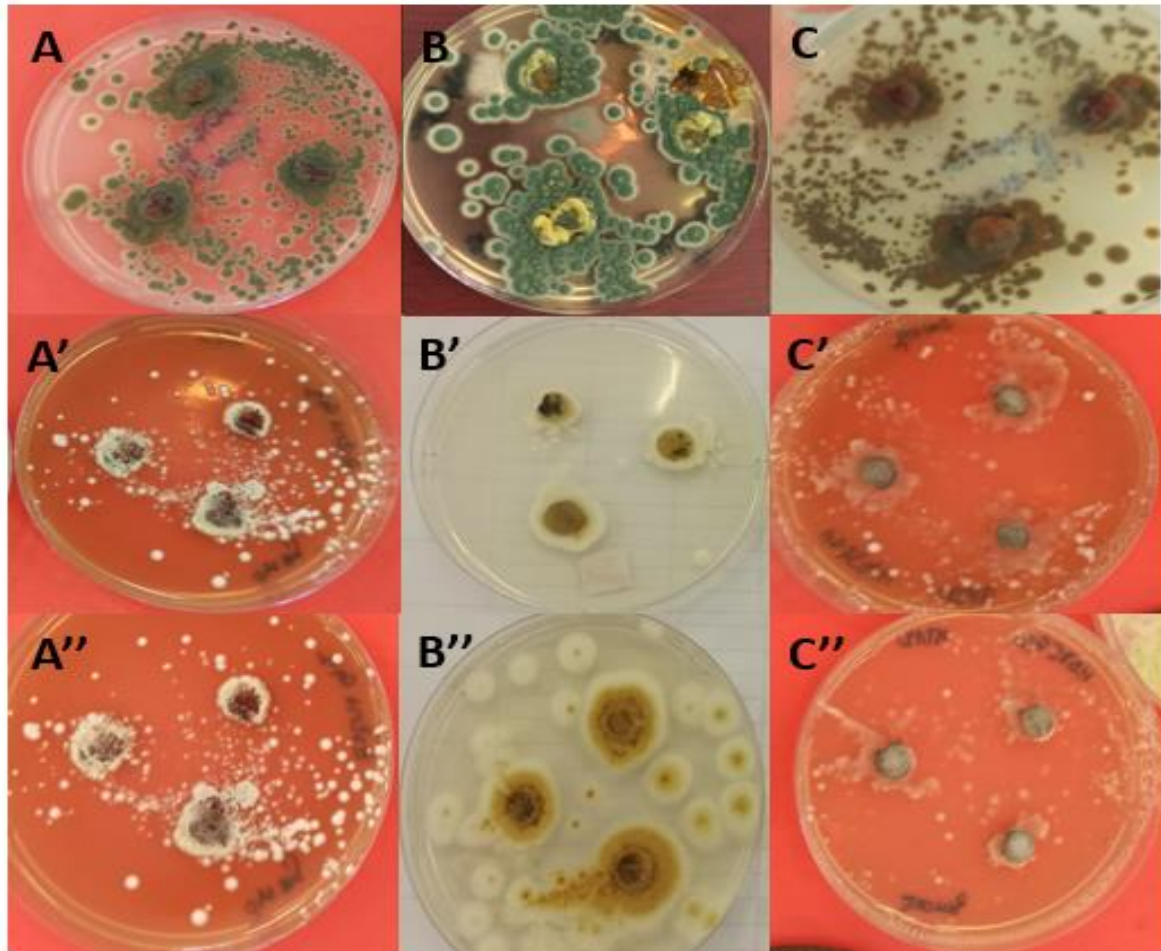
notes : Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions suivie de l'erreur standard  $\pm$ , \*\*\*Hautement significatif, \*\*Moyennement significatif, \*Significatif, n.s. non significatif ( $p \geq 0,05$ ).

L'examen des résultats affichés sur les tableaux en ci-dessus, suggère que les extraits présentent une efficacité similaire sur la croissance mycélienne des isolats fongiques testés, quel que soit le milieu de culture utilisé.

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

### ➤ Cas de *Penicillium*

Les résultats de l'activité antifongique des extraits de feuilles de *J.regia* L. et d'*O.europaea* var rougette à l'égard des isolats fongiques appartenant au genre *Penicillium* spp. sont présentés dans la figure 52.



**Figure 52.** Effet de l'extrait tannique des feuilles de *J.regia* L. et des feuilles d'*O.europaea* var rougette sur la croissance mycélienne des isolats de *Penicillium* spp. \*(A,B,C : des souches témoins, A',B',C' : isolats traités par TNJ ; A'', B'', C'' : isolats traités par TNO . Concentration : à 10 mg/ml, température d'incubation : 28°C , durée d'incubation : 7 jours, milieu de culture :PDA )

D'après la figure 52, un faible taux de croissance est enregistré chez les différentes souches testées traitées par les extraits de feuilles de noyer commun et olivier cultivé comparativement aux témoins négatifs.

### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Le test LSD a montré une différence significative dans l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats du genre *Penicillium* spp. traités par les extraits tanniques (TNO et TNJ). Le pourcentage d'inhibition de la croissance varie après cinq jours d'incubation en fonction de la nature chimique de l'extrait, sa concentration et les souches testées utilisées. D'après les résultats (**Annexe 10**), l'ensemble des extraits des deux plantes ont eu un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur toutes les souches testées. La plus forte inhibition de la croissance a été enregistrée par les extraits tanniques TNO et TNJ vis-à-vis des souches fongiques isolées du genre *Penicillium* avec un taux d'inhibition d'environ 80% (**Fig.52**).

Le plus haut pourcentage d'inhibition moyen enregistré était de  $77.63 \pm 0.32\%$  et  $78.97 \pm 0.89\%$ , marqué par l'extrait TNJ et TNO (concentration 10mg/ml) contre l'isolat fongique du genre *Talaromyces* spp. (TAL 1) après 5 jours d'incubation à 28°C. Cependant, le taux d'inhibition le plus faible ( $24.07 \pm 0.64\%$ ) a été induit par l'extrait HMJ (10mg/ml) contre l'isolat Tal4 (**Tableaux 11,18 ; annexe 10**). D'après la figure 52, les extraits TNO et TNJ exercent une activité antifongique plus importante sur les isolats testés en comparaison avec les autres extraits et le produit chimique de référence chlorhydrate de terbinafine (10m/ml) (**Tableau 19 ; annexe 10**).

Les tableaux ci-dessous représentent les résultats de l'analyse statistique du test de Student (t), ce dernier avait pour but de faire une comparaison sur l'influence de l'emploi des deux types de milieu de culture (PDA et SWA) sur l'efficacité des extraits testés.

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

**Tableau 21.** Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de *J.regia* L. sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre *Penicillium* : comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test).

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne <i>Penicillium</i> spp.					
Extracts	Concentration (mg/mL)	PDA	SWA	Sig	Significance
HMJ	10	31.45±1.45	41.90±2.21	0.014	**
	5	27.18±5.73	25.01±6.16	0.926	n.s
	1,25	22.29±2.02	23.02±1.50	0.580	n.s
EPJ	10	62.73±1.79	42.10±1.62	0.028	**
	5	35,13±0.91	31.83±1.23	0.056	n.s
	1,25	20,81±0.79	15.96±1.01	0.047	*
CHJ	10	37.24±2.09	30.31±1.13	0.059	n.s
	5	27.07±1.76	21.91±1.34	0.028	**
	1,25	17.88±1.10	15.12±0.93	0.620	n.s
AEJ	10	34.66±1.48	27.81±1.41	0.049	*
	5	22,39±1.61	17.43±1.38	0.122	n.s
	1.25	13.07±0.81	9.84±1.38	0.189	n.s
BTJ	10	33.12±0.97	29.23±1.16	0.116	n.s
	5	24.01±1.05	20.10±0.95	0.010	**
	1.25	15.87±1.17	08.89±1.17	0.020	**
ACJ	10	66.48±1.41	61.79±1.26	0.601	n.s
	5	54.75±0.46	49.58±0.25	0.010	***
	1.25	45.09±0.86	40.59±0.92	0.803	n.s
TNJ	10	71.83±1.10	64.34±0.98	0.879	n.s
	5	63.29±1.02	54.07±0.79	0.406	n.s
	1.25	52.27±0.65	47.28±0.37	0.003	***

notes : Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions suivie de l'erreur standard ±, \*\*\*Hautement significatif

, \*\*Moyennement significatif, \*Significatif, n.s. non significatif (p ≥ 0,05).

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

**Tableau 22.** Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de *O.europeae* var rougette sur la croissance mycélienne sur milieu solide PDA et SWA vis-à-vis les isolats du genre *Penicillium*: comparaison entre les deux milieux de culture par le test t apparié (Student t test).

Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%) <i>Penicillium</i> spp.					
Extracts	Concentration (mg/mL)	PDA	SWA	Sig	Significance
HMO	10	34.68±1.47	28.17±1.05	0.144	n.s
	5	26.26±1.64	20.68±1.16	0.057	n.s
	1,25	16.77±1.42	12.23±1.28	0.532	n.s
EPO	10	62.73±1.79	42.77±1.46	0.068	n.s
	5	37.67±0.96	31.72±1.25	0.023	**
	1,25	22.00±0.88	16.30±0.91	0.436	n.s
CHO	10	37.75±1.99	29.99±1.19	0.029	**
	5	27.20±2.04	21.98±1.31	0.010	***
	1,25	17.42±1.11	29.99±1.19	0.208	n.s
AEO	10	33.26±1.03	28.44±1.22	0.269	n.s
	5	24.61±1.02	19.66±1.02	0.859	n.s
	1.25	15.77±1.19	08.51±1.29	0.794	n.s
BTO	10	33.46±1.02	29.49±1.17	0.895	n.s
	5	23.85±1.07	20.28±0.99	0.561	n.s
	1.25	16.32±1.17	10.01±1.96	0.051	*
ACO	10	66.58±1.52	62.24±1.24	0.299	n.s
	5	54.36±0.87	49.82±0.31	0.014	***
	1.25	45.07±0.88	40.58±0.92	0.076	n.s
TNO	10	73.63±1.35	64.64±1.03	0.212	n.s
	5	63.33±1.03	54.59±0.73	0.201	n.s
	1.25	51.87±0.77	47.35±0.34	0.002	***

notes : Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions suivie de l'erreur standard  $\pm$ , \*\*\*Hautement significatif, \*\*Moyennement significatif, \*Significatif, n.s. non significatif ( $p \geq 0,05$ ).

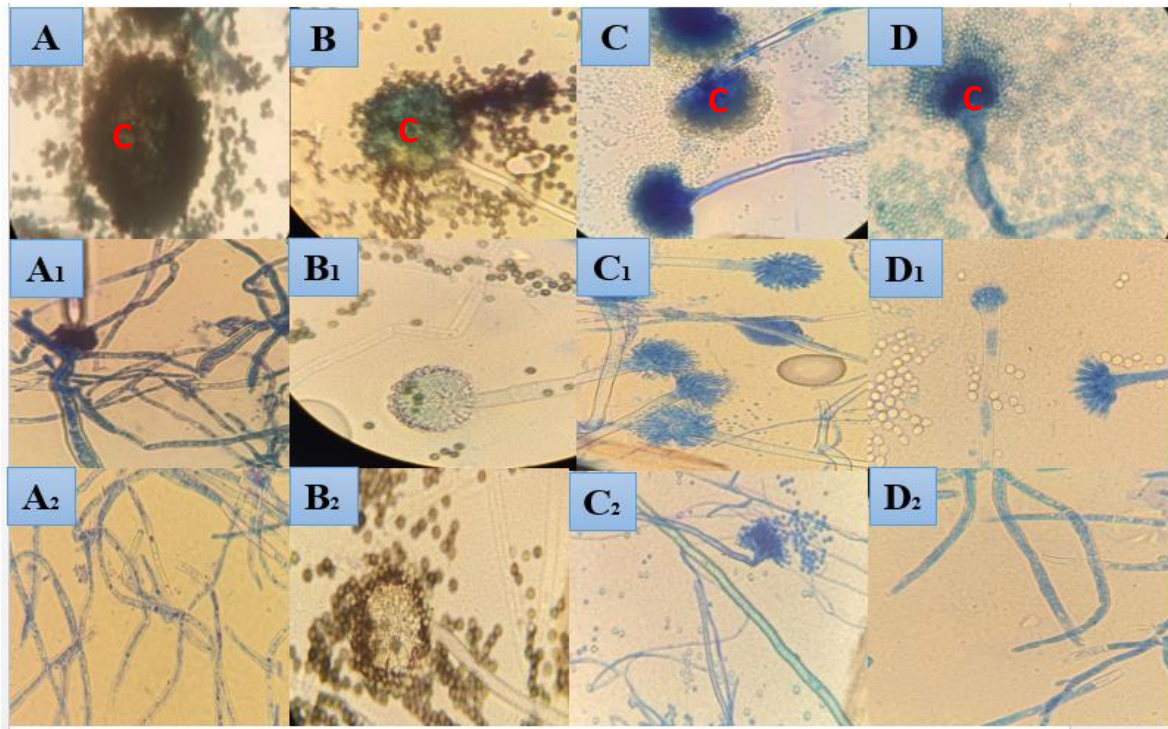
L'analyse statistique du test de Student (t) présenté dans le tableau 21 et 22, montre que la composition des milieux testés (PDA et SWA) n'affecte pas l'efficacité antifongique des extraits de feuilles de noyer et d'olivier cultivé et elle est non significative pour la plupart des extraits et des concentrations testés, ce qui indique que les extraits présentent la même efficacité sur les souches fongiques quelques soit le milieu de culture utilisé.

Par ailleurs, les extraits de feuilles testés ont montrés une variabilité dans l'efficacité d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats testés. En effet, la meilleure inhibition a été obtenue pour les extraits TNO et TNJ. Ces derniers ont enregistrés des modifications dans



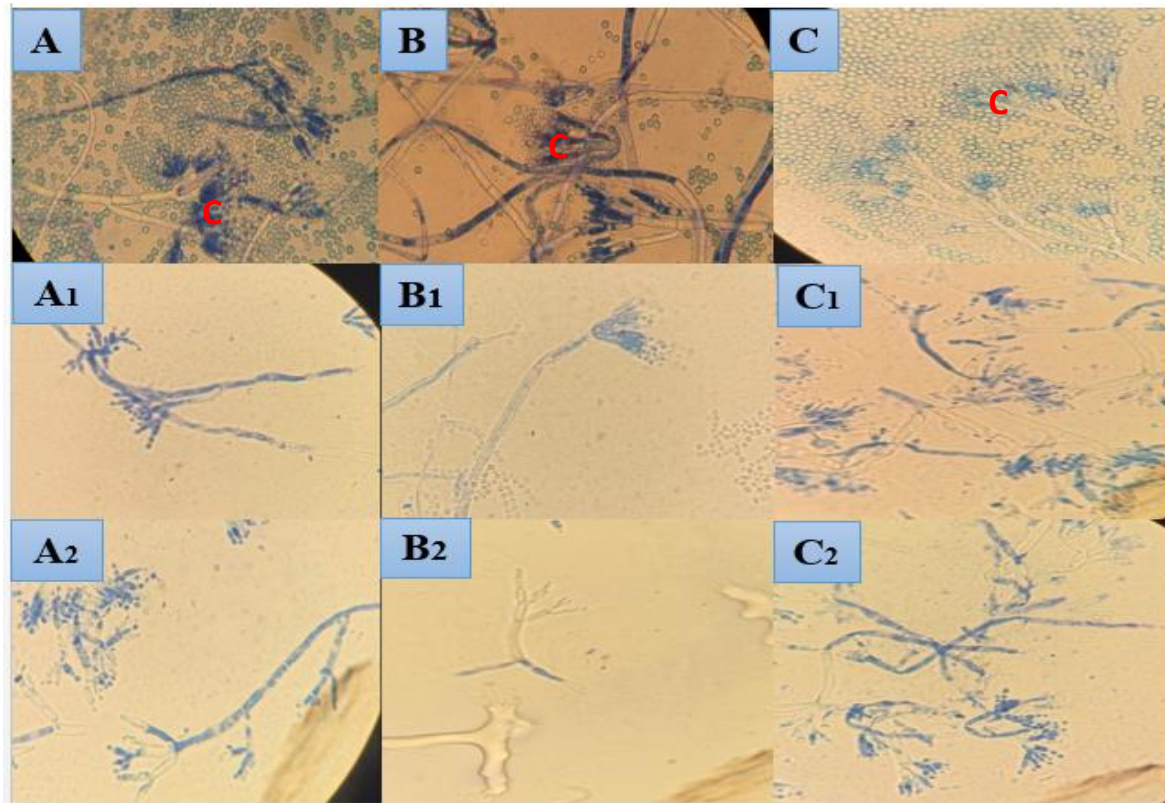
### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

l'aspect, la couleur du mycélium, ceci a été confirmé par les observations microscopiques menées à l'échelle cellulaire (**Fig 53 et 54**).



**Figure 53.** Aspect microscopique des isolats fongiques du genre *Aspergillus* après expositions aux extraits tanniques des feuilles de noyer et d'olivier cultivé (TNO et TNJ).

\*(*A.niger* (ON796542): (A) non traité, (A<sub>1</sub>) traité par TNO, (A<sub>2</sub>) traité par TNJ ; *A. brasiliensis* ATCC16404 :(B) non traité, (B<sub>1</sub>) traité par TNO, (B<sub>2</sub>) traité par TNJ ; *A. sclerotiorum* (OP542354) :(C) non traité, (C<sub>1</sub>) traité par TNO, (C<sub>2</sub>) traité par TNJ ; *A.fumigatus* : (D)non traité, (C<sub>1</sub>) traité par TNO,(C<sub>2</sub>) traité par TNJ) (**GX100**).



**Figure 54.** Aspect microscopique de certains isolats fongiques du genre *Penicillium* après expositions aux extraits tanniques des feuilles de noyer et d'olivier cultivé (TNO et TNJ).

\*(*T. funiculosus* OR193001 :(A) non traité, (A<sub>1</sub>) traité par TNO, (A<sub>2</sub>) traité par TNJ ; *T.chrysogenum* OR193002 :(B) non traité, (B<sub>1</sub>) traité par TNO, (B<sub>2</sub>) traité par TNJ ;*Talaromyces* spp.:(C) non traité, (C<sub>1</sub>) traité par TNO, (C<sub>2</sub>) traité par TNJ) (GX100).(C : conidies)

#### ➤ Cas d'*Aspergillus*

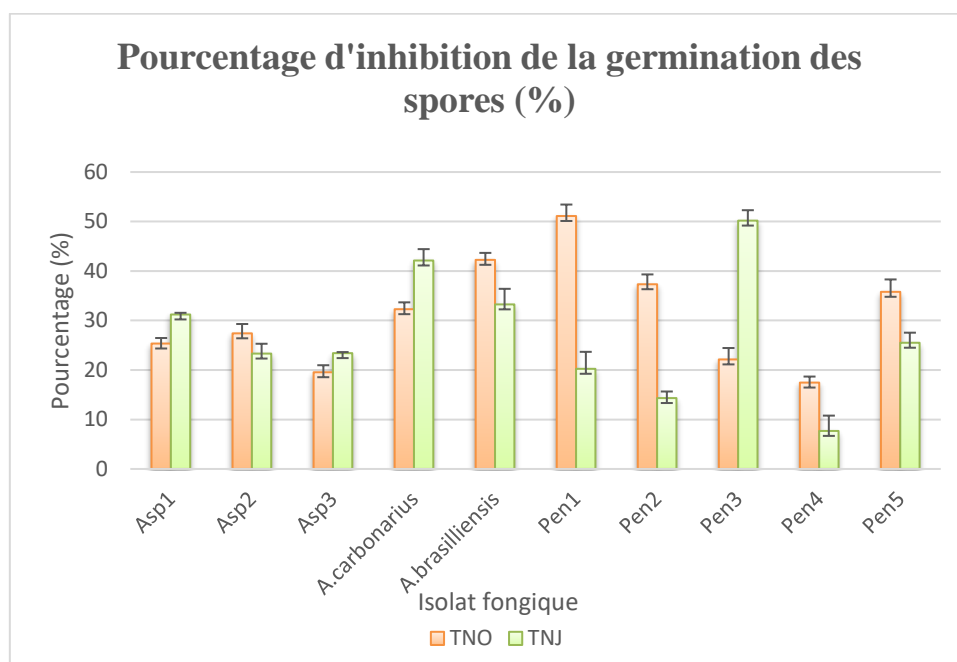
D'après la figure 53, les souches traitées présentent une différence microscopique notable : pour l'ensemble des souches traitées par TNJ, nous observons une absence totale de conidies et de phialides chez *A. niger* ON796542 et *Aspergillus* sp. "Asp 3". En revanche, ces composants sont plus petits que la normale pour l'espèce *Aspergillus sclerotiorum* OP542354 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Concernant les souches traitées par le TNJ, nous constatons uniquement un rétrécissement de la taille des conidies et des phialides par rapport aux souches non traitées.

### ➤ Cas de *Penicillium*

D'après la figure 54, les souches traitées révèlent des variations significatives à l'échelle microscopique, marquées par l'absence de conidies et de phialides, ainsi qu'une réduction de taille du mycélium et des modifications dans la structure de ce dernier.

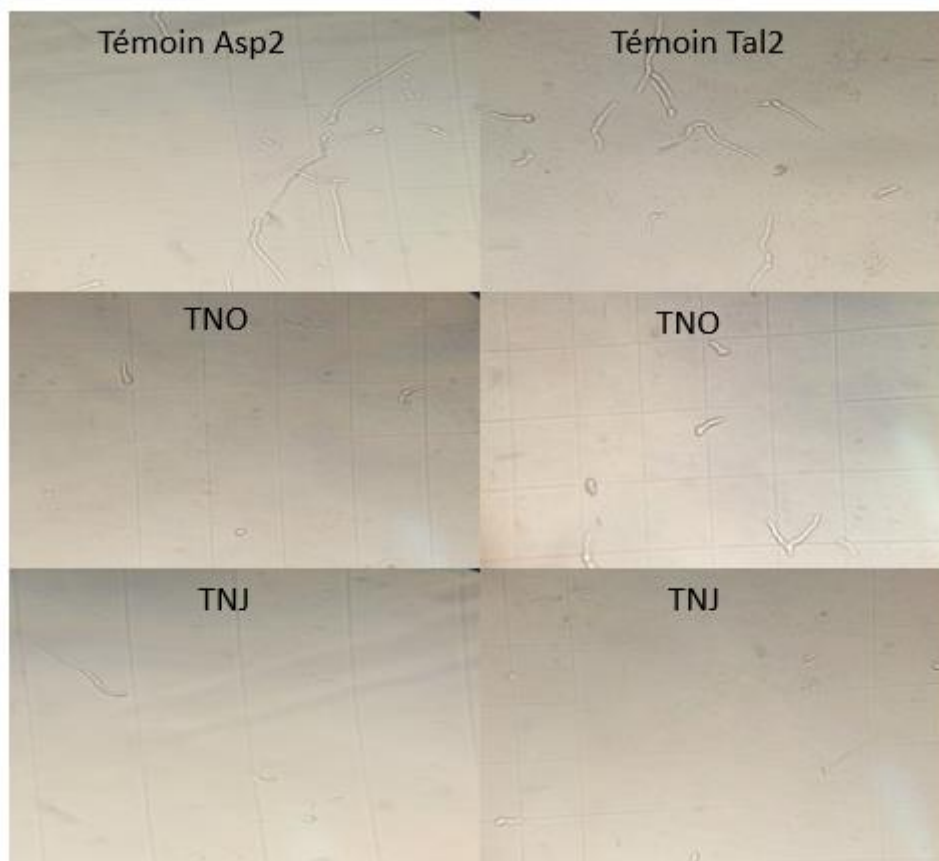
#### III.2.3.2. Effet sur la germination

La germination des conidies constitue une phase importante dans le cycle de croissance d'un champignon, cette partie avait pour but d'évaluer l'effet anti-germinative des extraits qui ont montrés la meilleure inhibition de la croissance mycélienne à savoir : TNO et TNJ. Les résultats sont présentés dans les figures 55 et 56.



**Figure 55.** Pourcentage d'inhibition de la germination des spores des isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* par les deux extraits tanniques (TNO et TNJ).





**Figure 56.** Action des extraits TNO et TNJ sur la germination des conidies de l'isolat d'*Aspergillus* et de *Penicillium* en comparaison avec les témoins après 24h d'incubation (GX40).

Les résultats issus de l'effet de TNO et TNJ sur la germination des spores obtenus ont montré une sensibilité des conidies des souches du genre *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp. vis-à-vis des deux extraits tanniques testés à des degrés variables (**Figure 55, 56**). Après 24 h d'incubation, le pourcentage moyen d'inhibition varie de 17.45 % (Pen2) à 35.79% (Pen5) exposés au TNO et 7.68% (Pen4) à 50.18% (Pen3) exposés au TNJ. Tandis que les souches du genre *Aspergillus* spp. ont marqué des inhibitions variant de 19.54% et 23.4% (Asp3) exposés au TNO et TNJ respectivement.

Par ailleurs, on constate que le pourcentage d'inhibition de germination est aussi important sur les souches de références testées s'évaluant à 42.25% pour *A.brasiliensis* ATCC 16404 et de 42.12% pour *A.carbonarius* M333) traitées par TNO et TNJ respectivement (**Fig.55 et 56**).

### III.3. Discussion

Les céréales sont des denrées alimentaires fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage ou au cours du stockage des grains (**Feillet, 2000**).

L'altération des céréales stockés a fait l'objet de nombreuses études ayant mis en évidence que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales expliquée par des variations qui affectent les paramètres technologiques des grains (**Atalla et al., 2003 ; Molinié et al., 2005**).

Lors de la contamination du blé, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production des toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en mycoflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage (**Rehman, 2006, Lahouar et al., 2015**).

les résultats attribués à la qualité physicochimique indiquent que les prélèvements analysés du blé tendre des dix échantillons renferment des pourcentages de grains brisés supérieurs, au pourcentage fixé par les normes commerciales qui imposent qu'un blé tendre de qualité ne doit pas dépasser les 3% (**Molinié et al., 2005**).

L'augmentation du nombre de grains cassés peut s'expliquer par divers facteurs influençant l'état physique du blé. Parmi ces facteurs figurent les conditions de récolte défavorables, les défaillances mécaniques des équipements, et surtout les chocs subis par les grains lors de leur transport mécanique vers les silos. La présence de grains brisés favorise la formation de foyers de contamination, ce qui rend le stockage à long terme défavorable (**Tahani et al., 2008**). De plus, les grains peuvent être endommagés, fissurés ou altérés par les insectes, créant ainsi des conditions propices à la prolifération de moisissures (**Le Bars et al., 1987**).

L'humidité relative, qui représente la quantité d'eau libre disponible dans un échantillon, joue un rôle majeur dans divers phénomènes d'altération biologique des aliments, en particulier d'origine fongique. Malgré des taux d'humidité relative proportionnellement bas, nos échantillons, ces derniers sont comptés parmi les produits peu hydratés. Néanmoins, ceci n'a point empêché leur contamination par la flore fongique xérotolérante prédominante (**Bellí et al., 2004**). Il est important de noter que de nombreux produits contenant peu d'eau libre, sont

### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

généralement résistants aux altérations bactériennes, mais sujets à des altérations fongiques (**Duron et al., 1999**).

Les échantillons analysés présentent des taux d'humidité compris entre 9,67 % et 12,5 %. En comparaison avec la norme citée par **Boudreau et al. (1992)**, qui préconise une fourchette de 9 % à 13 %, ainsi que la norme maximale de 14,5 % établie par le **Codex stan (199-1995)**, les valeurs observées sont relativement élevées, ce qui pourrait potentiellement favoriser le développement de moisissures.

Les résultats des taux de cendres des échantillons du blé tendre sont de :  $1.22 \pm 0.32\%$  (M'sila-Bt),  $1.32 \pm 0.11\%$  (Blida-HD),  $1.43 \pm 0.01\%$  (Blida-Bt),  $1.44 \pm 0.02\%$  (Constantine-Bt),  $1.51 \pm 2.1\%$  (Tizi-HD),  $1.65 \pm 1.02\%$  (Batna-Bt),  $1.76 \pm 0.19\%$  (Batna-ARZ1),  $1.92 \pm 1.01\%$  (Relizane-AA),  $2.01 \pm 0.01\%$  (Relizane-HD). Ces valeurs sont largement inférieures aux normes (2.20 et 2.5%) cités par **Jarrige et al. (1995)**, et **Feillet. (2000)** respectivement.

Les faibles teneurs en cendres observées dans nos échantillons laissent supposer qu'elles sont utilisées par les microorganismes pendant la synthèse des enzymes, comme mentionné par **Dupin et al. (1992)**.

La détermination du pH fournit des informations sur l'évolution de l'acidité du milieu en fonction du métabolisme des microorganismes, comme indiqué par **Hadj et al. (2001)**. Selon **Duron et al. (1999)**, les champignons peuvent se développer dans des plages de pH allant de 3 à 8, avec un optimum de croissance situé entre 5 et 6. Ainsi, nos échantillons analysés ont révélé un pH légèrement acide à neutre (entre  $6.32 \pm 0.12$  et  $7.52 \pm 0.33$ ), favorable au développement des champignons. L'analyse de la variance pour les paramètres physico-chimiques n'a révélé aucune différence significative ( $p \leq 0.05$ ) entre les échantillons analysés.

Les grains de céréales constituent un substrat excellent pour le développement des moisissures, comme l'indique **Mills (1990)**. L'analyse mycologique a permis d'isoler 282 souches de moisissures à partir de différents échantillons de blé tendre stocké. Malgré l'apparence saine des grains, le taux élevé de leur contamination révèle la présence d'une contamination profonde. Ce phénomène est attribuable à la charge initiale en spores qui, après incubation, trouve un milieu propice à leur germination et à la formation de mycéliums, comme le soulignent **Tahani et al. (2008)**.

### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

L'identification macro et microscopique nous a permis d'attribuer ces isolats fongiques aux genres suivants: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium* et *Ulocladium* avec une prédominance des genres *Aspergillus* et *Penicillium* avec des pourcentages égales à : 29.71% et 23.12% respectivement. En se basant sur la littérature, ces genres de moisissures contaminent les grains de blé dès la récolte dans l'épi et persistent tout au long du processus de stockage. Ces mêmes genres ont été signalés sur les grains de blé par la **F.A.O. (1984)** et confirmés par les travaux de **Tahani et al. (2008)**.

La variation observée peut être occasionnée, dans certains cas, par des facteurs tels que les conditions climatiques, les paramètres de stockage (humidité, température et système de ventilation), ainsi que l'établissement d'une charge fongique significative. Ces éléments peuvent entraîner des modifications qualitatives et quantitatives de la flore fongique (**Le Bars et al. (1987)**, **Miller (2002)** et **Wilson et al. (2002)**). Les auteurs précités soulignent que la contamination fongique des céréales, que ce soit sur le champ ou pendant le stockage, est directement liée aux conditions hygrothermiques.

Les divers genres de moisissures que nous avons identifiés sont des contaminants courants des denrées alimentaires qui ont reçu un traitement inadéquat et en particulier qui ont été mal conservées. Ils sont également reconnus comme des contaminants fréquents dans le stockage des céréales et de leurs dérivés, ainsi que parmi d'autres champignons phytopathogènes des champs (**Berthier et Valla,1998** et **Multon,1982**).

La présence des genres *Aspergillus* et *Penicillium* dans la flore contaminant des céréales a été relevée dans plusieurs études, telles que celles menées par **Le Bars et al. (1987)** et **Riba et al. (2005)**. En conséquence, les espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement classées comme des moisissures associées au processus de stockage, comme l'indiquent les travaux de **Withlow et al. (2001)**.

Dans l'ensemble, le taux élevé de contamination et la biodiversité significative observée dans les deux échantillons de blé tendre peuvent probablement s'expliquer par la qualité, la durée et les conditions de stockage (**Davis et al., 1987**).

### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Sur la base des caractères morphologiques décrits par **Botton (1990); Guiraud (1998) ; Leyral et al., (1998)** ainsi que celles de **Chabasse et al., (2002)**, huit isolats fongiques ont été assignés au genre *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp.. L'étude morphologique des isolats d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp. a porté sur l'observation des conidies et phialides et la présence ou absence de conidiospores ainsi que l'aspect cultural de la croissance des colonies (couleur, texture). Nous avons pu relever des différences entre les souches d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp. (*Talaromyces* spp.), en revanche, la couleur des colonies semble virer de vert-vert olive à vert foncé, parfois jaune clair ou carrément un noir . Cela indique une variabilité au sein du même genre.

Les résultats de l'analyse phylogénétique ont montré que les souches de *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp. utilisées dans cette étude forment un arbre portant des groupes d'espèces reliés entre eux. L'analyse phylogénétique a généré deux arbres chaque arbre est formé de 2 groupes correspondant aux espèces: *A.niger* , *A.sclerotiorum*, *T. funiculosus* et *P.chrysogenum*.

L'analyse des séquences ITS de Asp1 et Asp2 a révélé leur appartenance à l'espèce *A.niger* et *A.sclerotiorum* respectivement, cette analyse a été confirmée par les critères phénotypiques conformés aux tests moléculaires. L'analyse des séquences  $\beta$ -tubuline de Pen 2 et Pen 3 a permis d'affilier ces deux souches à l'espèce *P.chrysogenum*, *T. funiculosus* , respectivement, cela a été confirmé par les critères phénotypiques.

L'identification précise, des espèces d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp. basée sur la morphologie est difficile en raison de la similitude de certains caractères morphologiques (**Cordova-Lopez, 1998**). Par conséquent, avec l'approche des méthodes moléculaires et les outils d'identification basés sur l'analyse des séquences des gènes, il est possible d'identifier les espèces d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp. (**Arunmozhi Balajee et al., 2009; Tian et al., 2021**).

L'alignement et l'analyse phylogénétique des deux souches Asp1 et Asp2 ont montré une similarité des séquences ITS de 100 % avec les séquences de référence de *A.sclerotiorum* (OP542354) et *A.niger* (ON796542) respectivement. Les deux souches Tal2 et Tal3 ont montré une similitude des séquences  $\beta$ -tubuline de 97% et de 99% avec les souches de référence *P.chrysogenum* (OR193002) et *T.funiculosus* (OR193001) respectivement.

### CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Comme démontré précédemment dans la première partie, étant donné la richesse des extraits des feuilles de *J. regia* L. et *O. europaea* var rougette en composés phénoliques, nous avons jugé intéressant de conduire des tests antifongiques de ces extraits sur quelques souches isolées de blé tendre stocké.

L'ensemble des extraits testés pour leurs pouvoirs antifongiques sur les deux types de milieux solides PDA et SWA ont révélé une réduction significative de la croissance mycélienne des isolats du genre *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp. par rapport aux témoins, une différence significative du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été enregistrée entre les extraits testés. Par contre la variabilité des milieux de culture (PDA et SWA) n'a aucun effet significatif sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats testés. L'inhibition de la croissance des souches fongiques est probablement due à la nature de la composition chimique des extraits testés et à leurs potentiels fongicides, fongistatiques et anti-germinatifs.

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont bien connus pour leurs activités mycotoxigènes et leurs contaminations de la chaîne alimentaire, ce qui constitue une grave menace pour la sécurité de l'alimentation humaine et animale (Riba *et al.* 2008, Navale *et al.* 2021). Les résultats de notre étude soulignent que les extraits de feuilles de ces plantes arboricoles pour l'industrie alimentaire, particulièrement dans le domaine de la conservation des aliments, citons parmi elles celles menées par Sharma *et al.* (2008), Sharma *et al.* (2009), Djeugap *et al.* (2011), Husein *et al.* (2012), Zakavi *et al.* (2013), Amadi *et al.* (2014), Hubert *et al.* (2015), Winowska *et al.* (2016), Kocacaliskan *et al.* (2018), Djenane *et al.* (2019), Clodoveo *et al.* 2021, Wei *et al.* (2022).

Notons, que cette étude reste la première en son genre à l'échelle nationale, qui a traité l'effet antifongique des feuilles de *J. regia* et d'*O.europaea* var rougette cultivé dans la Mitidja, wilaya de Blida, Algérie sur des souches fongiques du genre *Aspergillus* et *Penicillium*.

La diminution de la croissance mycélienne, la modification de l'aspect macroscopique et microscopique sont en fonction des genres fongiques, et la concentration et la composition chimique des extraits testés.

Selon la littérature, certaines molécules identifiées sont dotés de propriétés antifongique, antibactérien, allélopathique et d'autres activités biologiques ce qui s'ajuste avec la multitude

## CHAPITRE III ETUDE MYCOLOGIQUE ET ACTIVITE ANTIFONGIQUE

de biomolécules identifiées auparavant dans la partie phytochimique par les analyses chromatographiques (les terpènes, les phytostérols, les stéroïdes, les acides gras, les alcanes, les cétones, les lipides phénoliques, les composés alcooliques, les tanins, des flavonoïdes,.....) ce qui indique que le pouvoir antifongique de nos extraits est le résultat de la présence de quelques molécules majoritaires tels que le juglone, ou bien c'est due à l'effet synergique de l'association de plusieurs molécules de différentes familles de métabolites secondaires (**Ryu et al. 2003, Agoramoorthy et al. 2007, Altieri et al. 2007, Gibka et al. 2009, Wang et al. 2010, Mihailovi et al. 2011, Pohl et al. 2011, Ghanbari et al. 2012, Karanja et al. 2012, Yogeswari et al. 2012, Marrufo et al. 2013, Audrain et al. 2015, Nandhini, 2015, Pereira et al. 2016, Sharma et al., 2016, Banaras et al. 2017, Fincheira et al. 2017, Marchese et al. 2017, Al-Huqail et al. 2019, Monteiro et al. 2019, Zhang et al. 2020, Langa-Lomba et al. 2021, Rossi et al. 2021, Akhtar et al. 2022, Kazeminejad et al. 2022**).

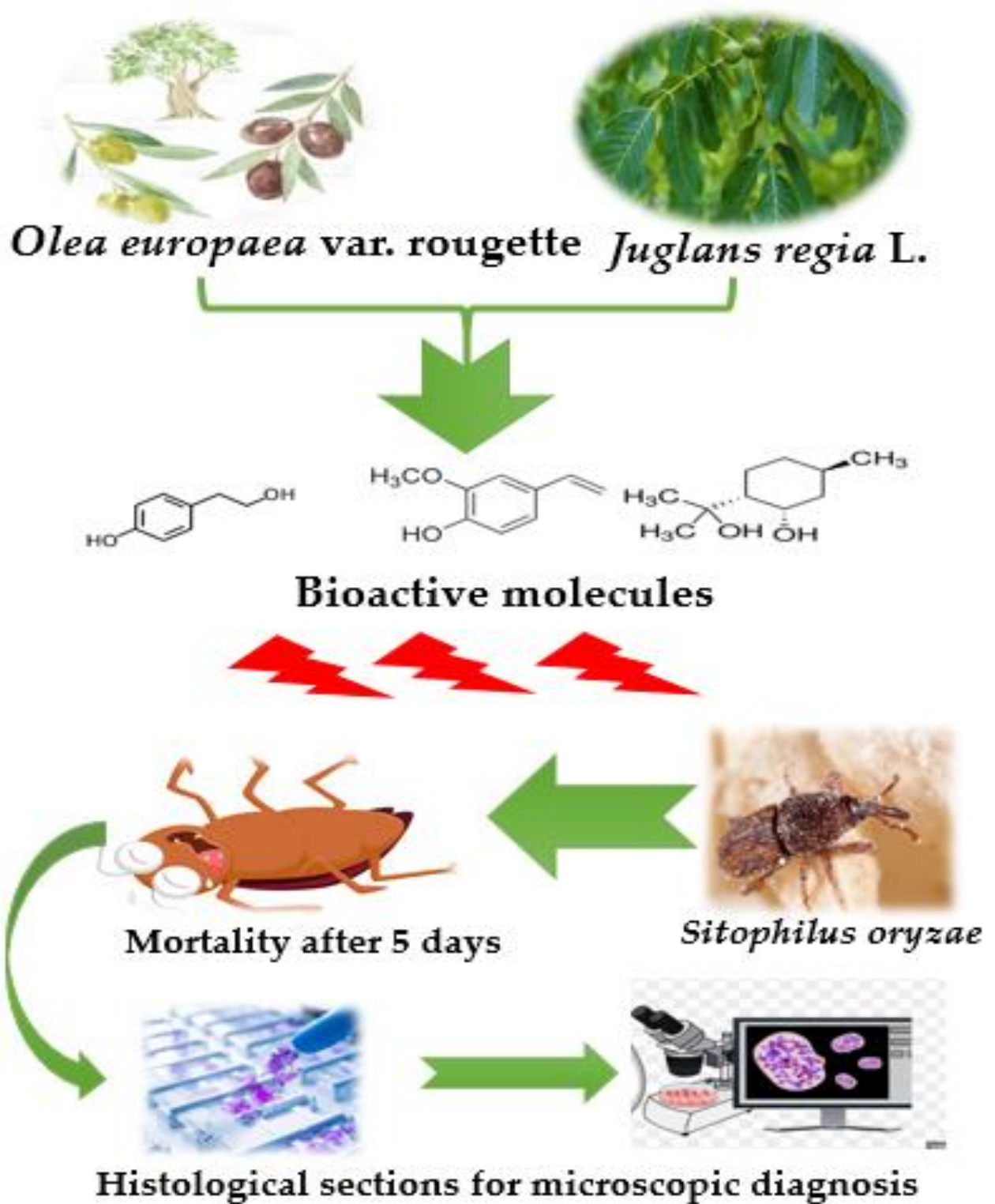
### III.4. Conclusion

De ce qui précède, nous concluons que les extraits de noyer commun et d'olivier cultivé utilisés dans nos essais présentent une activité inhibitrice de la croissance mycélienne et de la germination chez les souches testées, ceci est probablement due à dénombrables molécules bioactives caractérisant ces extraits.

**CHAPITRE III.**  
**ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE**  
**HISTOLOGIQUE**



# GRAPHICAL ABSTRACT



## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

De nombreux systèmes de stockage reposent sur l'utilisation d'insecticides et de fumigants synthétiques, tels que le bromure de méthyle et la phosphine, pour lutter contre les ravageurs de denrées stockées (**Kheirkhah et al., 2015**). Les pesticides chimiques sont économiques et efficaces, mais ils ont l'inconvénient de provoquer une résistance chez les insectes traités et sont nocifs pour l'environnement et l'homme (**Nayak et al., 2003; Delimi et al., 2017**). C'est pour cette raison que les scientifiques se sont orientés vers la recherche de nouvelles molécules avec plus d'efficacité et moins d'impacts négatifs sur l'environnement et les êtres vivants (**Mishra et al., 2019**).

La présente partie porte sur l'évaluation de l'effet insecticide des différents extraits préparés des deux plantes *Olea europaea* var rougette et *Juglans regia* L. vis-à-vis des adultes du Charançon du riz. La description de la symptomatologie et l'action des doses létales sur les structures tissulaires et cellulaires des parties abdomen et la tête de ces insectes ont été en butte à cette étude.

### IV.1. Matériel et Méthodes

#### IV.1.1. Matériel

Le matériel biologique utilisé dans cette étude concerne les insectes de denrée stockée le charançon du riz (*Sitophilus oryzae*).

Le matériel non biologique (équipements, réactifs, produits, consommable...) est représenté dans l'annexe n 12.

##### IV.1.1.1. Origine des insectes et élevage

Les individus de *Sitophilus oryzae* proviennent de l'école nationale supérieure des sciences Agronomique d'El Harrach, Alger. L'élevage est conduit dans une étuve obscure réglée à une température de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , et une humidité relative de  $70\pm 5\%$ . Les adultes au nombre de 50 sont placés dans des bocaux d'une capacité de 1 litre couvert par un tulle moustiquaire (**Fig.57**).

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE



**Figure 57.** Dispositif d'élevage des charançons du riz *S.oryzae*.

Afin de permettre la continuité des infestations et la perpétuité d'élevage nous avons procédé à des transferts réguliers des insectes dans de nouveaux bocaux. Le support d'élevage est constitué par des grains de blé tendre variété HD 1220 fourni par la CCLS de Blida.

### IV.1.2.Méthodes

#### IV.1.2.1. Test de toxicité

Les essais portés sur l'étude de l'effet des extraits de feuilles de noyer et d'olivier cultivé sur le charançon du riz, ont été effectués au laboratoire de Recherche de Valorisation et Conservation des Ressources Biologique (VALCORE), Faculté des sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes.

##### IV.1.2.1.1. Préparation des insectes

La récupération des adultes de *S.oryzae* a été faite à l'aide d'un système de tamis. Pour faciliter le dénombrement des adultes et pour éviter leurs écrasements, de pinces fines ont été utilisés.

Les essais de traitements par les extraits ont été effectués dans les mêmes conditions que l'élevage en masse (blé tendre comme substrat ; obscurité, température :  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  et d'humidité :  $70\% \pm 5\%$ ).

##### IV.1.2.1.2. Préparation des concentrations des extraits

Les extraits de feuilles des deux plantes Noyer et Olivier, ont été dissoutes dans l'acétone. Les concentrations retenues : 625, 315, 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ont été obtenues suite à des dilutions selon la formule :

$$C1V1 = C2V2$$

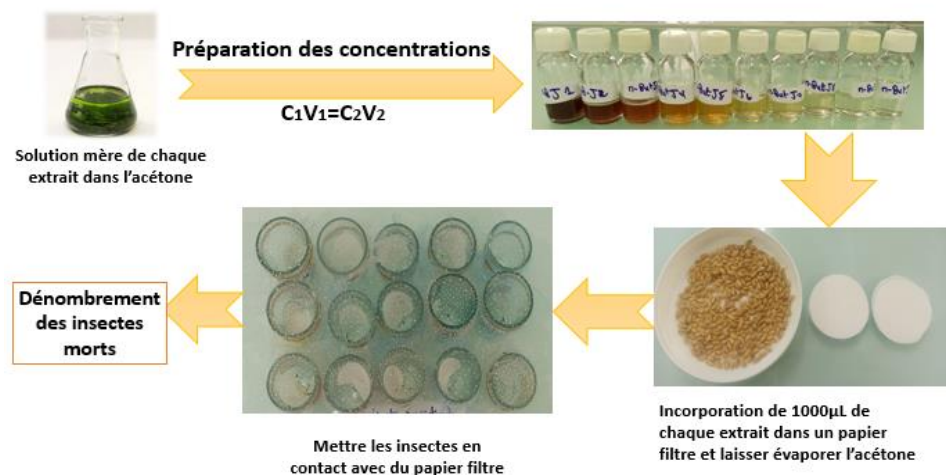
C1 : concentration initiale ; V1 : volume initial ; C2 : concentration finale ; V2 : volume final.

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

### IV.1.2.1.3. Application

Pour évaluer l'activité insecticide des différents extraits de noyer commun et de l'olivier cultivé, des disques de papier filtre (Whatman N°1) de 2,1 cm de diamètre, ont été imprégnés à l'aide d'une micropipette avec 1mL de différentes concentrations d'extraits (625, 315, 75 µg/mL) dissouts dans l'acétone et les disques sont par la suite placés dans des flacons en verre. Pour chaque flacon, 10 adultes ont été placés sans sexage en présence de 5g de blé tendre. Le témoin négatif qui correspond à l'acétone a été préparé dans les mêmes conditions expérimentales (Fig.58).

L'insecte est considéré mort lorsqu'il est complètement immobile ne présentant aucun mouvement au niveau des pattes et des antennes (Lee *et al.*, 2004; Mediouni Ben Jemâa *et al.*, 2012). Le comptage des individus morts a été entamés 24h après le début du traitement.



**Figure 58.** Schéma du protocole expérimental suivi lors de l'évaluation de l'activité insecticide des extraits de feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette.

### IV.1.2.1.4. Expression des résultats

L'efficacité d'un produit est évaluée par la mortalité. Le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tué par ce toxique. En effet, les pourcentages de mortalité doivent être corrigés par la formule d'Abbott (1925):

$$MC\% = \frac{(M - Mt)}{(100 - Mt)} \times 100$$

MC: la mortalité corrigée ; M: pourcentage de morts dans la population traitée ; Mt: pourcentage de morts dans la population témoin.

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

### ➤ Calcul des doses létales 50% et 90% (DL<sub>50</sub>, DL<sub>90</sub>)

L'efficacité d'un toxique se mesure par sa DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> qui représentent les quantités de substance toxique entraînant la mort de 50% et de 90% d'individus d'un même lot respectivement. Elles sont déduites à partir du tracé des droites de régression. Pour cela, les pourcentages de mortalité corrigés sont transformés en probits et les doses en logarithme décimal (Cavelier, 1976) (Annexe 13).

### ➤ Calcul des temps létaux 50 et 90 (TL<sub>50</sub>, TL<sub>90</sub>)

L'efficacité d'un toxique se mesure par sa TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> qui représentent le temps nécessaire pour que ce dernier cause la mort à 50% et 90 des individus d'un même lot. Ils sont déduits à partir du tracé des droites de régression. Pour cela, les pourcentages de mortalité corrigés sont transformés en probits et les temps en logarithme décimaux (Annexe 13). Nous avons analysé les données de la mortalité corrigée en fonction des doses et en fonction du temps par le logiciel SPSS (version 25) à l'aide de la méthode des probits.

Pour chaque donnée testée, le logiciel détermine une valeur de chi-deux qui tient compte de l'écart entre la mortalité observée et la mortalité théorique. La somme des chi-deux associés à chaque point donne le chi-deux global avec le nombre de degrés de liberté (DDL = nombre de données - 2), pour lequel on peut calculer une probabilité  $P$ .

– Si  $P > 0,05$  la courbe log-probit s'ajuste statistiquement à une droite.

– Si  $P < 0,05$ , les données sont trop hétérogènes et ne sont pas représentées par une droite.

#### IV.1.2.2. Analyse statistique

Les données recueillies (mortalité, DL<sub>50</sub>, DL<sub>90</sub>, TL<sub>50</sub>, TL<sub>90</sub>) ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) suivi par un test post-hoc de Tukey pour détecter des différences significatives au seuil de 5%. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 25.

#### IV.1.2.3. Etude histologique

Afin de pouvoir déterminer l'effet des extraits sur l'ultrastructure des insectes, nous avons effectués des coupes histologiques sur des adultes de *Sitophilus oryzae* traités par la DL<sub>50</sub> des

## CHAPITRE IV *ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE*

extraits ayant plus d'efficacité. La technique histologique a été réalisée au centre hospitalo-universitaire Nafissa Hamoud Ex Parnet, Alger, selon **Hould et de Shawinigan (1994)**.

### **IV.1.2.3.1. Dissection de l'insecte**

A l'aide de pinces fines, la tête et l'abdomen sont séparés puis immédiatement immergés dans le liquide fixateur. Les dissections sont faites rapidement (1 à 2 min) dont les lésions n'affectent pas le fonctionnement des structures (**Gabe, 1968**).

### **IV.1.2.3.2. Réalisation des coupes histologiques**

#### ➤ **Fixation et incubation**

Les deux parties prélevées des individus témoins et traités, ont été fixés dans une solution de Formol à 10%, pendant 24h à température ambiante. Cette étape a pour but de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire, tout en renforçant la consistance du tissu (**Djoudad-kadji et al., 2011**), puis elles sont placées dans des cassettes histologiques marquées avant d'être plongées dans un récipient contenant le fixateur. Ces cassettes ont été mises ensuite dans un panier de l'appareil automate de circulation, contenant 12 cuves où ont été réalisées ces trois étapes :

#### ➤ **La déshydratation**

Elle se fait par le passage des échantillons dans huit cuves d'éthanol de concentrations croissantes (80, 90, 95 and 100 %) pour une durée de 1h30 min chacune. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus pour les préparer à l'inclusion (**Alturkistani et al., 2015**).

#### ➤ **La clarification**

Elle dure une heure, et a été effectuée par le passage du panier dans deux bains de xylène. Cette étape élimine toute trace d'éthanol dans l'échantillon (**Alturkistani et al., 2015**).

#### ➤ **L'inclusion (imprégnation)**

Elle a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine de 1 heure chacun à une température de 56°C (**Alturkistani et al., 2015**).



## CHAPITRE IV *ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE*

### ➤ **Enrobage et confection des coupes**

Les échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince puis placés dans des moules en inox avant de les remplir de paraffine liquide. Les moules ont été déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine pour la réalisation des coupes. Par la suite, les blocs de paraffine ont été démoulés pour y être placés à nouveau dans un microtome afin de confectionner les coupes voulues dont l'épaisseur est de 5 µm. Ces rubans ont été immergés un court instant dans un bain-marie de 60°C. Les lames ont été rangées sur un porte-lame puis placées dans l'étuve pendant une durée d'une heure à 60°C, avant d'être immergées dans un solvant (bain de xylène) pendant la même durée de temps afin d'éliminer toute trace de paraffine, et ainsi permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus (Alturkistani *et al.*, 2015).

### **IV.1.2.3.3. Coloration et montage des coupes**

La coloration des lames a été faite avec deux colorants qui permettent de mettre en évidence la morphologie cellulaire et tissulaire : l'hématoxyline basique qui colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet et l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose (Kierszenbaum, 2006).

Les lames ont tout d'abord été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Par la suite, elles ont été plongées dans un bain d'éosine pendant 3 minutes avant de subir un ultime rinçage.

La dernière étape de l'histologie est le montage ; il se déroule par le passage des lames dans un bain d'éthanol suivi d'un bain contenant un mélange d'éthanol/xylène et pour finir dans deux bains successifs de xylène. Quelques gouttes de colle biologique ont été déposées sur des lamelles avant d'être placées sur les lames. Les lames et les lamelles ont été par la suite séchées à l'air libre. L'observation a été effectuée à l'aide d'un microscope optique de type Moti.

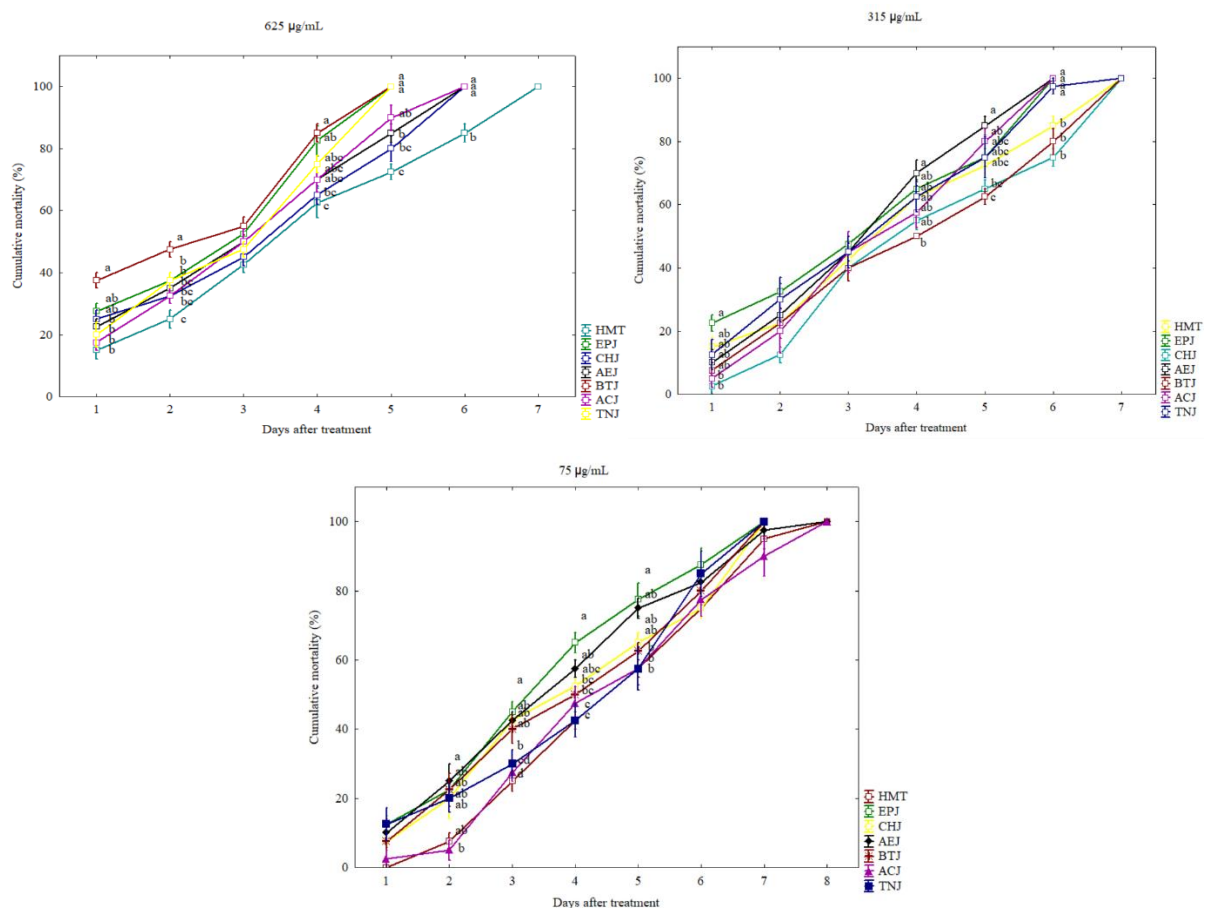
## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

### IV.2. Résultats

#### IV.2.1. Évaluation de l'activité insecticide des extraits des feuilles de noyer commun et d'olivier cultivé sur les adultes de *S.oryzae*

- Cas du Noyer commun

Dans le but de connaître l'effet insecticide des extraits de feuilles de noyer commun (HMJ, EPJ, CHJ, AEJ, BTJ, ACJ et TNJ), nous avons évalué l'impact de ces bio-insecticides sur la mortalité des adultes de *S.oryzae* en fonction du temps à travers les différentes doses (625, 315 et 75  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig.59). L'estimation du degré d'efficacité des extraits a été faite à partir du nombre d'adultes morts. Les pourcentages de mortalités sont corrigés par la formule d'Abbott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle, et de connaître la toxicité réelle des extraits.



**Figure 59.** Évolution des taux de mortalité moyennes corrigées cumulées ( $\pm$  ES) des adultes du *S.oryzae* après traitement avec les extraits brutes et fractions flavonoïques et tanniques de *J.regia* L. à la concentration 625 $\mu\text{g/mL}$ , 315 $\mu\text{g/mL}$ , 75  $\mu\text{g/mL}$ . Les valeurs portant différentes lettres étaient significativement différentes sur la base de  $P \leq 0,05$ .



## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes du charançon du riz traités par les extraits brutes et les fractions flavonoïques et tanniques des feuilles de *J.regia* L. à la concentration 625, 315 et 75 µg/mL sont exprimés par la moyenne des quatre répétitions et leurs erreurs standards (**Tableaux en Annexe 13 et Fig.59**).

L'examen des tracées des pourcentages de mortalités moyennes cumulée chez les adultes du charançon du riz exposés aux extraits de feuilles de *J.regia* L. (**Fig59**), nous laissent emmètrant que les mortalités enregistrées varient dans le temps selon la nature d'extrait et sa concentration. En effet, pour la forte concentration (625µg/ml) uniquement les extraits EPJ, BTJ et TNJ ont engendré les 100% de mortalité au bout du 5<sup>ème</sup> jour de traitement.

A la concentration de 315 µg/ml et après 6 jours, la mortalité peut atteindre les 100% suite à l'exposition aux extraits AEJ et EPJ. Une mortalité de 100% des adultes de charançon du riz a été atteinte au bout du 7<sup>ème</sup> jour suite à leurs expositions aux extraits tannique (TNJ) et éther-pétrolique (75µg/ml).

L'effet insecticide a été remarqué 24h après l'exposition aux fractions de EPJ, BTJ et TNJ dont les mortalités occasionnées sont comprises entre 20-37.5%.

L'analyse de la variance en fonction du temps (jours) et des doses testées (625, 315 et 75 µg/ml) (**Fig.59 et tableaux en annexe 15**), permet d'avancer, pour des  $P < 0,004$  et  $P < 0,000$ , des différences significatives à hautement significatives qui confirme l'incidence positives des extraits sur la mortalité des adultes de *S.oryzae*.

Le test post-hoc de Tukey a permis de classer les taux de mortalité en fonction des extraits et du temps (Jours). Il permet de constituer des groupes homogènes de traitement, ainsi les moyennes appartenant au même groupe sont considérées comme non différentes et sont représentées par la même lettre ou parfois sans lettre. Les classements des moyennes à travers le test post-hoc de Tukey au seuil de 5%, aux jours, sont portés sur la figure 59 (a, b et c) qui illustre également l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des adultes de charançon du riz traités par les sept extraits de feuilles de noyer commun.

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

- **Cas de l'olivier cultivé**

L'estimation du degré d'efficacité des extraits de feuilles d'olivier cultivé a été faite à partir du nombre d'adultes morts. Les pourcentages de mortalités sont corrigés par la formule **d'Abbott (1925)**.

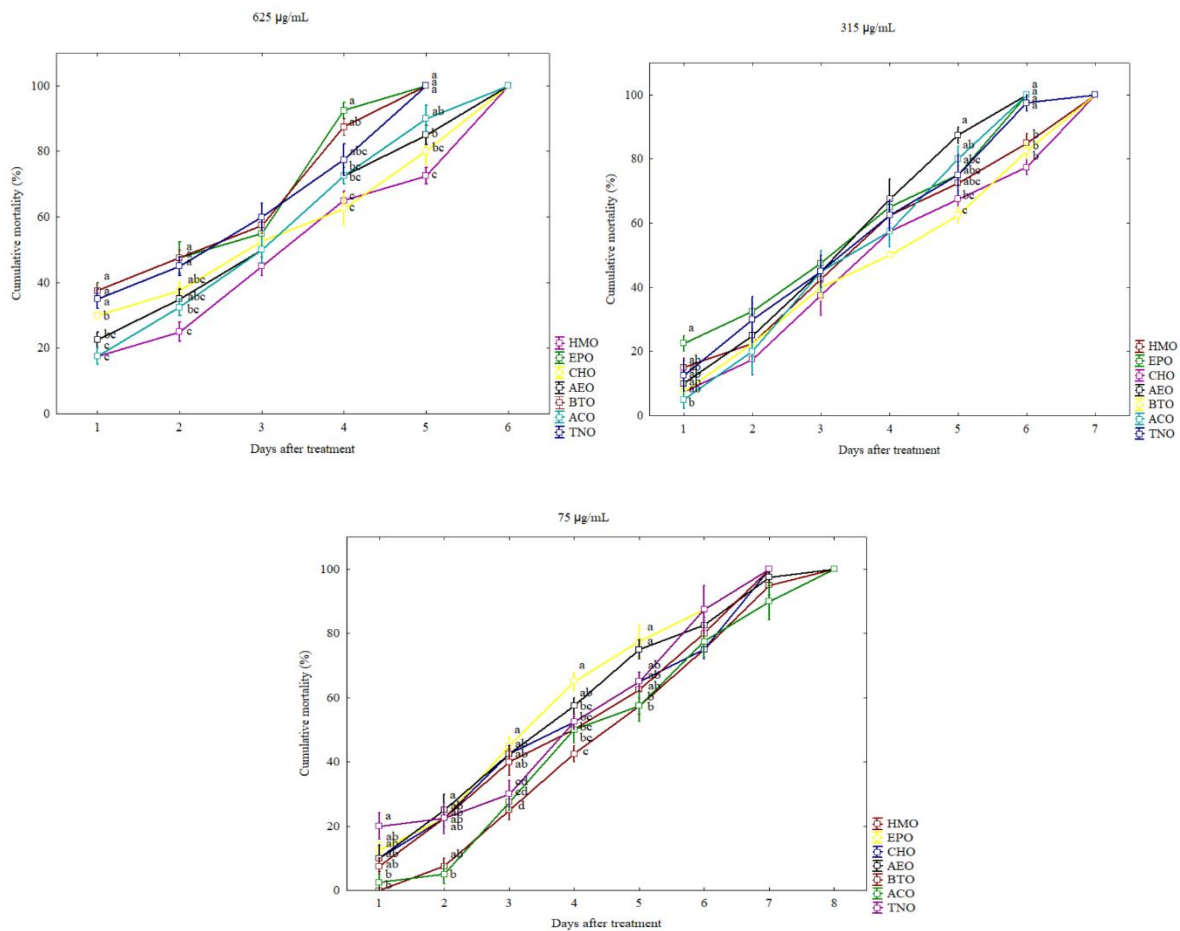
Les résultats relatifs aux pourcentages de mortalités moyennes du charançon du riz traités par les extraits brutes, les fractions flavonoïques et tanniques des feuilles d'olivier selon les concentrations retenues (625 µg/mL, 315 µg/mL et 75 µg/mL) sont exprimés par la moyenne des quatre répétitions et leurs erreurs standards (**Tableaux en Annexe 13 et Fig.60**).

L'examen des tracées des pourcentages de mortalités moyennes cumulée chez les adultes du charançon du riz exposés aux extraits de feuilles d'*O.europaea* var rougette (**Fig.60**), nous laissent en outre constater que les mortalités enregistrées varient dans le temps selon la nature d'extrait et sa concentration. En effet, les adultes de *S.oryzae* exposés aux extraits de EPO, BTO et TNO à la dose de 625 µg/ml ont atteint au 5<sup>ème</sup> jour les 100% de mortalité et sont suivis par ceux traités aux extraits de AEO et de ACO dosés à 315 µg/ml (6<sup>ème</sup> jour). Les individus mis en contact avec les extraits tannique et butanolique utilisés à la concentration 75 µg/ml ont mis par contre 7 jours pour succomber en totalité (100%).

L'effet insecticide a été remarqué 24h après l'exposition des adultes de charançon aux fractions : EPO, BTO et TNO dont les mortalités occasionnées sont comprises entre 20- 49.5%.

Les mortalités chez les individus traités évoluent progressivement dans le temps selon les concentrations des extraits, vérifiant ainsi le modèle dose-réponse décrivant la probabilité d'une réponse donnée dérivant d'une exposition à une molécule toxique donnée dans une population donnée, en fonction de la dose.

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE



**Figure 60.** Évolution des taux de mortalité moyennes corrigées cumulées ( $\pm$  ES) des adultes du *S.oryzae* après traitement avec les extraits brutes et fractions flavonoïques et tanniques de *O.europaea* var rougette à la concentration 625µg/mL, 315µg/mL, 75 µg/mL. Les valeurs portant différentes lettres étaient significativement différentes sur la base de  $P \leq 0,05$ .

L'analyse de la variance en fonction du temps (jours) et des doses testées (625, 315 et 75 µg/ml) (**Fig.60 et tableaux en annexe 15**), permet d'avancer, pour des  $P < 0,0002$  et  $P < 0,000$ , des différences significatives à hautement significative qui confirme l'incidence de l'effet des extraits sur la mortalité des adultes de *S.oryzae*.

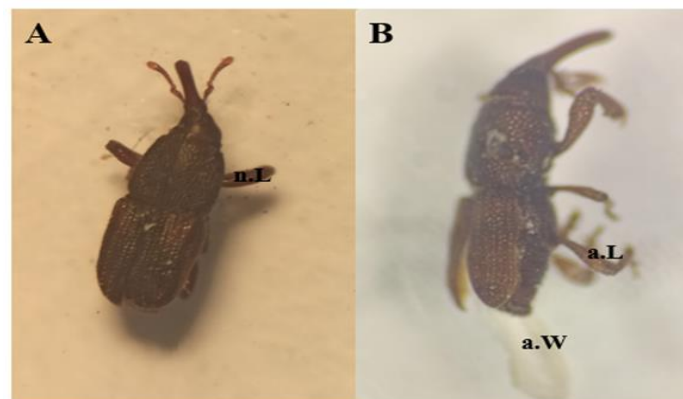
Le test post-hoc de Tukey a permis de classer les taux de mortalité en fonction des extraits tout au cours des jours. Il permet de constituer des groupes homogènes de traitement, ainsi les moyennes appartenant au même groupe sont considérées comme non différentes et sont représentées par la même lettre ou parfois sans lettre. Les classements des moyennes à travers le test post-hoc de Tukey au seuil de 5%, aux jours, sont portés sur la figure 60 qui illustre également l'allure de la progression des pourcentages de mortalité des adultes de charançon du riz traitées par les sept extraits de feuilles d'olivier cultivé.

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

Dans l'ensemble, les résultats des essais biologiques attestent que les mortalités chez les individus traités évoluent progressivement dans le temps selon les concentrations des extraits, vérifiant ainsi le modèle dose-réponse décrivant la probabilité d'une réponse donnée dérivant d'une exposition à une molécule toxique donnée dans une population donnée, en fonction de la dose.

### ➤ Symptomatologie

Quel qu'en soit le type de traitement apporté, le comportement des adultes de charançon exposés aux extraits de feuilles de noyer et d'olivier cultivé a été significativement affecté comparativement aux adultes témoins de la même génération. Les insectes traités montrent de signes de perturbations physiologiques apparentes initiées par une désorientation suivie d'une phase d'incoordination des mouvements puis d'une tétanisation (**Fig.61A-B**). La mort survient plus ou moins rapidement selon la dose et le type de fraction apportée.



**Figure 61.** Aspect externe des différentes parties du corps chez les adultes de *S.oryzae* non traités (A) et traités (B) observées à la loupe (X40). (n.P : patte normale ; a.P : patte altérée ; a.A : aile altérée).

### IV.2.2. Doses létales

Le potentiel insecticide et la toxicité des extraits de feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette ont été évalués en calculant la dose permettant de tuer 50% et 90% de la population de *S.oryzae* au 3eme jour qui suit le traitement à partir des droites de régression exprimant les probits de pourcentages de mortalités en fonction de Log dose (**Annexe 14**). L'analyse de l'anova (chi-deux) des doses létales a montré une corrélation positive entre les mortalités et les concentrations et la nature de l'extrait (**Tableau 23**).

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

**Tableau 23.** Doses létales, estimées par une analyse de probabilité *Probit*, des extraits de feuilles de deux plantes *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette nécessaires pour tuer 50 et 90% des adultes du charançon du riz après 3 jours de traitement.

Extraits	DL <sub>50</sub> (95%IC)	DL <sub>90</sub> (95 %IC)	χ <sup>2</sup>	Equation
<b>HMJ</b>	133.44±3.89(37.139-239.928) <sup>a</sup>	142.93± 55.56×10 <sup>2</sup> (3.41 ×10 <sup>3</sup> -39.03×10 <sup>6</sup> )	1.057	0.59X-1.26
<b>HMO</b>	131.25±2.79(45.36-223) <sup>a</sup>	9149.17±2984.83(2749.12-2484.21710 <sup>3</sup> )	0.553	0.91X-1.9
<b>EPJ</b>	14.96±1.79(0.034-54.22) <sup>c</sup>	30.61 ± 0.74×10 <sup>2</sup> (923.37-1439.65×10 <sup>3</sup> )	0.226	0.58X-0.71
<b>EPO</b>	33.95±0.74 <sup>c</sup>	1110.77±275.47	15.504	0.97X-1.58
<b>CHJ</b>	45.6±0.47(0-130.987) <sup>c</sup>	2383.67 ×10 <sup>3</sup> (4923.933-0)	0.420	0.38X-0.62
<b>CHO</b>	67.02±19.71 <sup>b,c</sup>	20828.41±17703.86	0.088	0.27X-0.45
<b>AEJ</b>	63.47±3.06(7.45-128.73) <sup>b,c</sup>	78.43± 1.56×10 <sup>2</sup> (1950.578-236.95×10 <sup>3</sup> )	1.061	0.61X-1.11
<b>AEO</b>	41.39±13.15 <sup>c</sup>	1960.058±334.82	0.005	0.65X-1.39
<b>BTJ</b>	30.5±0.67 <sup>c</sup>	3898.57 ± 325.79	5.163	1.03X+2.01
<b>BTO</b>	106.33±0.01 <sup>a,b</sup>	2312.431±173.49	21.27	1.06X-2.14
<b>ACJ</b>	130.52±26.0(20.87-189.93) <sup>a</sup>	14395.93±83.36(2853.94-18241.46 10 <sup>3</sup> )	0.832	0.6X-1.22
<b>ACO</b>	111.52±22.91(11.98-164.11) <sup>a,b</sup>	16850.73±3300.803(2616.33-2086.4 10 <sup>3</sup> )	1.810	0.44X-0.64
<b>TNJ</b>	118.04±5.86 (65.55-183.9) <sup>a,b</sup>	3934.845.39(1378.73-217.44 10 <sup>2</sup> )	0.223	0.92X-1.93
<b>TNO</b>	66.49±3.08(12.89-126.58) <sup>b,c</sup>	4885.48±279.96(1583.97-279.75 10 <sup>3</sup> )	1.669	0.7X-1.29
<b>F;P</b>	13.56; 0.000	3.28; 0.05		

**Note.** χ<sup>2</sup> : chi deux, IC : intervalle de confiance. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes sur la base de P < 0,05.

Selon l'analyse de probabilité Probit, les valeurs de la dose de fractions causant 50% de mortalité, après sept jours de traitement, étaient significativement différentes entre les souches ( $P=0,0000$ ). La valeur de DL<sub>50</sub> la plus élevée a été estimée à 133.44 µg/mL pour HMJ, tandis que les valeurs de DL<sub>50</sub> les plus faibles, 14.96 , 30.5 , 33.95 et 41.39 µg/mL, ont été observées pour BTJ, EPJ,EPO et AEO respectivement. D'autre part, les valeurs de la concentration entraînant la mort de 90% de la population ne diffèrent pas significativement entre nos fractions ( $F= 3,28 ; P = 0,05$ ).

### IV.2.3.2. Temps létaux

Des différences significatives ont été enregistrées pour les valeurs de TL50 et TL90 entre nos extraits lorsqu'elles ont été appliquées à une dose de 625 µg/mL (**Tableau 24**).

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

**Tableau 24.** Temps létaux, estimés par une analyse de probabilité *Probit*, des extraits de feuilles *J.regia* L. *O.europeae* var rougette nécessaires pour tuer 50 et 90% des adultes de *S. oryzae* soumis à une concentration de 625 µg/mL.

Extraits	TL <sub>50</sub> (95% IC)	TL <sub>90</sub> (95% IC)	χ <sup>2</sup>	Equation
<b>HMJ</b>	2.79 ± 0.06 (2.074-3.604) <sup>b,c,d</sup>	6.70 ± 0.10 (5.51-11.60) <sup>a,b,c</sup>	41.917	2.65X-1.25
<b>HMO</b>	2.83±0.75(2.33-3.33) <sup>b,c,d</sup>	7.21±0.13(6.47-10.64) <sup>a,b</sup>	20.447	4.42X_2.82
<b>EPJ</b>	2.01 ± 0.01 (1.204-2.73) <sup>d,e</sup>	4.58 ± 0.04 (3.31-8.68) <sup>f,g</sup>	63.268	2.29X-3.93
<b>EPO</b>	2.78±0.11(2.18-3.48) <sup>b,c,d,e</sup>	6.20±0.11(4.98-9.48) <sup>c,d</sup>	34.727	3X-1.39
<b>CHJ</b>	2.53 ± 0.07 (1.39-3.28) <sup>b,c,d,e</sup>	6.03 ± 0.04 (4.21-13.44) <sup>c,b</sup>	67.158	2.08X-3.75
<b>CHO</b>	3.19±0.03(2.34-4.089) <sup>a,b,c</sup>	7.45±0.11(5.64-14.002) <sup>a,b</sup>	46.581	2.51X-1.38
<b>AEJ</b>	2.31 ± 0.01 <sup>b,c,d,e</sup>	5.39 ± 0.09 (4.08-9.60) <sup>d,e,f</sup>	49.210	2.46X-4.33
<b>AEO</b>	3.01±0.012(2.396-3.627) <sup>a,b,c,d</sup>	6.66±0.22(5.489-10.069) <sup>b,c</sup>	28.355	3.43X-1.59
<b>BTJ</b>	1.71 ± 0.03 (0.839-2.455) <sup>e</sup>	4.38 ± 0.01 (3.066-9.542) <sup>g</sup>	64.210	1.93X-0.47
<b>BTO</b>	3.26±0.049(2.47-4.139) <sup>a,b</sup>	7.49±0.16(5.583-12.76) <sup>a</sup>	45.517	2.76X-1.53
<b>ACJ</b>	2.41±0.10(1.702-3.031) <sup>b,c,d,e</sup>	5.43±0.32(4.028-8.293) <sup>d,e</sup>	44.859	2.96X-1.15
<b>ACO</b>	4.01±0.05 <sup>a</sup>	7.25±0.16 <sup>a,b</sup>	56.231	2.35X-1.21
<b>TNJ</b>	2.13±0.05(1.42-2.955) <sup>c,d,e</sup>	4.62±0.25(3.54-8.72) <sup>e,f,g</sup>	63.05	2.3X-0.93
<b>TNO</b>	3.02±0.018(1.72-4.37) <sup>a,b,c,d</sup>	7.48±0.18(5.106-26.312) <sup>a</sup>	87.647	3.9X-2.34
<b>F;P&lt;0.05%</b>	8.16 ; 0.000	51.53; 0.000		

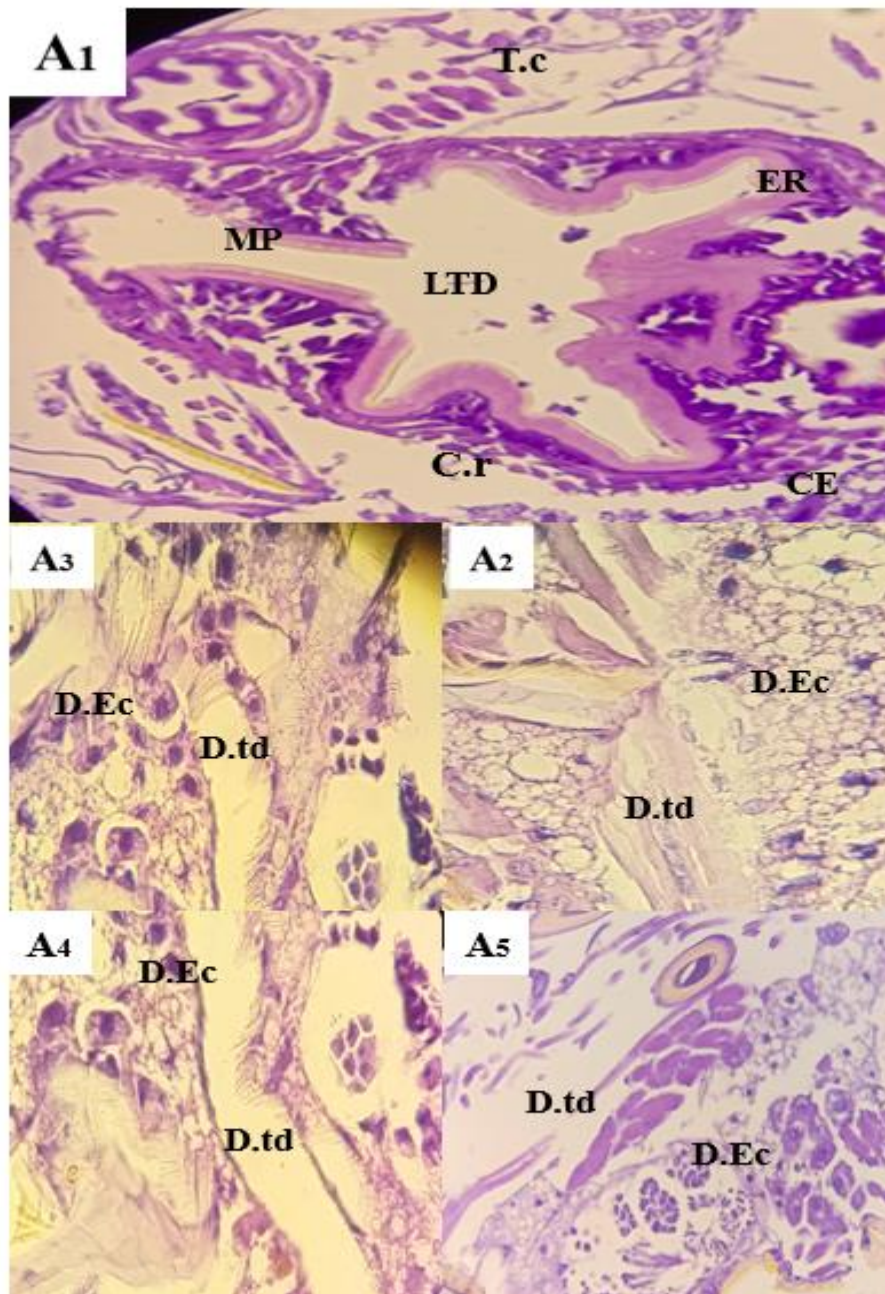
Note : DDL : degrés de liberté ; χ<sup>2</sup> : chi deux, IC : intervalle de confiance. Les valeurs portantes des lettres différentes sont significativement différentes sur la base de P < 0,05.

Les valeurs de *TL*<sub>50</sub> variaient de 1,71 à 4,01 jours entre les fractions, tandis que les valeurs de *TL*<sub>90</sub> différaient de 4,38 à 7,49 jours. Par ailleurs, les plus faibles *TL*<sub>50</sub> à *TL*<sub>90</sub> ont été notées pour la fraction BTJ (P < 0,05).

### IV.2.4. Etude histologique

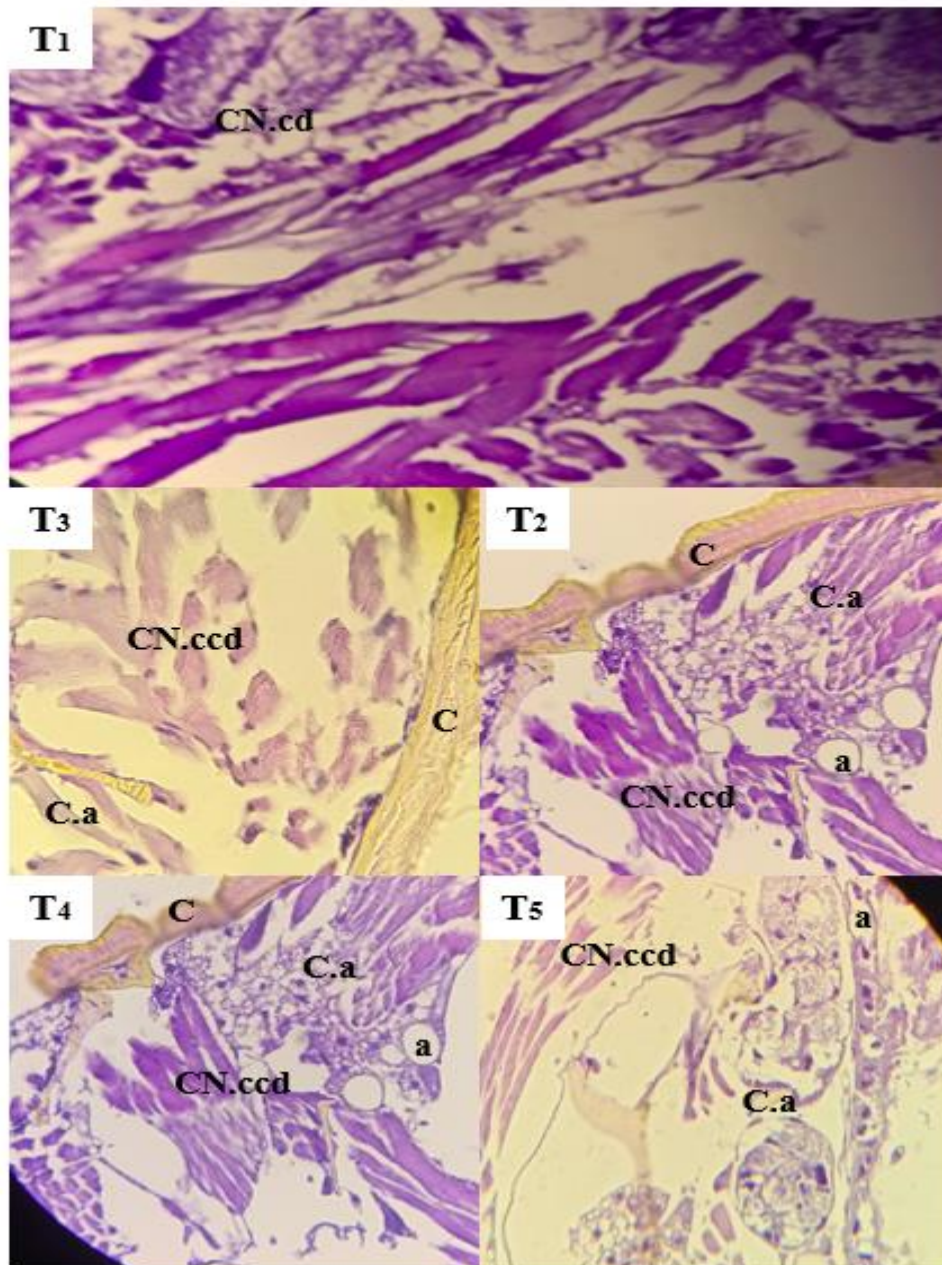
L'exposition des adultes de *S.oryzae* aux doses létales 50 des extraits de noyer et d'olivier cultivé a engendré des perturbations notables au niveau des parties prélevées (tête et abdomen) des insectes traités par rapport au témoin de même âge (**Fig. 62, 63**).





**Figure 62.** Photomicrographie d'une coupe longitudinale montrant la structure de l'abdomen d'un adulte de *S.oryzae* , témoin (A<sub>1</sub>), traité avec les DL<sub>50</sub> des fractions : EPJ (A<sub>2</sub>), BTJ (A<sub>3</sub>), EPO(A<sub>4</sub>) et AEO (A<sub>5</sub>) après 4 jours de traitement (G × 100).

**Note :** ER : épithélium de revêtement ; T.c : tissu conjonctif ; MP : membrane peritrophique ; LTD : lumière de tube digestif ; C.r : cellules régénératives ; CE : cellules épithéliales ; D.Ec : désorganisation des cellules épithéliales ; D.td : désorganisation du tube digestif.



**Figure 63.** Photomicrographie d'une coupe longitudinale montrant la structure de la tête d'un adulte de *S.oryzae* , témoin (T<sub>1</sub>), traité avec les DL<sub>50</sub> des fractions : EPJ (T<sub>2</sub>), BTJ (T<sub>3</sub>), EPO(T<sub>4</sub>) et AEO (T<sub>5</sub>) après 4 jours de traitement (G × 100).

**Note :** C : cuticule ; CN.cd : cellules neurosecrétrices a chromatine dense ; CN.ccd : cellules neurosecrétrices a cytoplasme clair et diffuse ; C.a : cellules altérées ; a : adipocyte.

L'histologie des parties cérébrale et abdominale des individus témoins, dans une coupe longitudinale, montre une apparence normale de l'intra-structure (la tête et l'abdomen) avec une couche cuticulaire bien délimité.



## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

L'étude histologique de la partie abdominale et des cellules cérébrales d'adultes de *S.oryzae* traités avec les deux différentes fractions EPJ et BTJ des feuilles de *J. regia* L., et EPO AEO des feuilles de *O.europaea* var rougette L. aux concentrations ( $DL_{50}$ ) 14.96 , 30.5 , 33.95 et 41.39  $\mu\text{g/mL}$  respectivement, a montré que ces fractions sont cytotoxiques par rapport au contrôle négatif et qu'elles agissent de la même manière. L'abdomen de *S.oryzae* (**Fig.62-A1**) présente des structures bien définies chez le témoin alors que les individus traités (**Fig.62-A2,A3,A4 et A5**) présentent une désorganisation totale des structures, un contenu cellulaire digéré, une altération des tissus et une disparition du tube digestif qui est le signe d'une intoxication.

Au niveau du cerveau des individus témoin (**Fig.63-T1**) les cellules neurosécrétrices présentent noyau clair à chromatine condensée en amas dans le Pars intercerbralis. En revanche, chez les individus traités, les cellules neurosécrétrices ont des noyaux pycnotiques avec une chromatine dense et un cytoplasme clair (**Fig.63-T2, T3, T4 et T5**).

### IV.3. Discussion

En Algérie, la culture du blé tendre (*Triticum aestivum* Linn.) joue un rôle crucial dans le régime alimentaire.(**Singh et al., 2023**) Cependant, cette culture est fortement menacée par les attaques de différents insectes au moment de leurs entreposages principalement *Sitophilus oryzae* (Coleoptaire : Curculionidae), qui entraîne des pertes économiques considérables(**Lucas et Riudavets; 2002**) Cette dernière partie focalise sur l'évaluation de l'effet insecticide des différents extraits des feuilles des deux arbres fruitiers cultivés en centre-nord Algérien : Noyer et Olivier.

Les résultats de la présente partie démontrent que les quatorze extraits testés présentent une activité insecticide significative contre les adultes de *S. oryzae* à différentes doses. Des variations de toxicité ont été observées entre les différents extraits au cours de l'étude de toxicité. Plus précisément, les extraits EPJ, BTJ, EPO et AEO lesquels ont montré des effets insecticides plus importants en comparaison avec les autres fractions. À la concentration la plus élevée (625  $\mu\text{g/mL}$ ), les extraits EPJ, BTJ, EPO et AEO ont entraîné une mortalité de 100 % des adultes de *S. oryzae* au cinquième jour après le traitement. Pour les concentrations plus faibles (315  $\mu\text{g/mL}$  et 75  $\mu\text{g/mL}$ ), les extraits EPJ, BTJ, EPO et AEO ont entraîné une mortalité de 100 % aux septièmes jours qui suit le traitement, ce qui indique une corrélation directe entre les concentrations de fractions flavonoïques et la mortalité des adultes. Nos résultats sont en accord avec la littérature consulté considérant l'effet insecticide des huiles essentielles contre *S. oryzae* (**Wang et al. 2012 ;Ali et al.,2017**).

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

L'étude menée par **Ellafi et al. (2023)** a évalué l'effet d'un extrait méthanolique de la racine de *J. regia* contre les promastigotes de *Leishmania amazonensis* et a rapporté un taux de mortalité de 50 % à une concentration de 100 µg/mL. Ces résultats, ainsi que ceux des études susmentionnées, suggèrent que la mortalité des organismes cibles dépend de la dose de l'extrait et de la période d'exposition.

Quant à l'étude spécifique sur la toxicité et l'effet anti-appétant des feuilles de *J. regia* contre *S. oryzae* menée par **Sadeghnezhad et al. (2020)**, elle a révélé une action modérée sur l'insecte testé, avec un taux de mortalité de 66,66 % observé au 14<sup>ème</sup> jour après le traitement avec une concentration de 0,1 g/mL. Alors que nos résultats dénotent une action plus élevées dans un délai assez courts. Il convient de noter qu'en dehors de **Sadeghnezhad et al. (2020)**, il n'existe aucune autre information disponible concernant l'utilisation des feuilles de *J. regia* L. en tant qu'agent de lutte biologique contre *S. oryzae*.

Cet effet est étroitement lié à la présence dans une grande gamme de métabolites bioactives dans les extraits et leurs actions est peut être attribué à leurs effet synergique.

La présence de juglone (5-hydroxy-1,4-naphtoquinone) ou ses dérivés dans les extraits de feuilles de noyer a été bien documentée dans des études antérieures, et elles sont considérées comme des composés actifs responsables de l'activité insecticide (**Wang et al., 2007**). La juglone et ses dérivés sont des composés phénoliques qui agissent comme des antioxydants naturels, mais qui présentent également une toxicité pour divers insectes, plantes, bactéries et champignons (**Wang et al., 2007 ; Bennacer et al., 2022**). Ses effets inhibiteurs et létaux sur les plantes et les insectes l'ont fait classer comme herbicide, insecticide et même comme composé allélopathique (**Ercisli et al., 2005 ; Campos et al., 2019 ; Maleita et al., 2022**).

Parmi les autres métabolites secondaires présents dans les extraits de feuilles de noyer, outre la juglone, figurent les terpènes, qui contribuent à la défense de la plante contre les insectes nuisibles. Certains terpènes, tels que les diterpènes et les triterpènes néoclérodane, présentent des caractéristiques cytotoxiques et une action insecticide contre certaines espèces d'insectes (**Wink, 2018**). Les résultats révélés par les analyses CGMS de nos extraits vont dans le même sens de ceux enregistrés lors des recherches antérieures lesquelles ont indiqué que les feuilles de *J. regia* ont une concentration élevée en terpènes (**Pungitore et al., 2005**).

Quant à l'olivier var rougette, aucune étude n'a été notée avec cette variété, contrairement aux autres variétés de la même espèce, qui présentaient le même effet insecticide que nos extraits. D'un autre côté, plusieurs travaux soulignent le pouvoir insecticide des feuilles d'*O. europaea* var *sylvestris* et d'*O. europaea* subsp *laperrinei* envers les autres ordres d'insectes comme les Lépidoptères *Spodoptera littoralis* et *Ephestia kuehniella* et les hémiptères comme le psylle

## CHAPITRE IV ACTIVITE INSECTICIDE ET ETUDE HISTOLOGIQUE

*Euphyllura olivina* respectivement (Benhamouda *et al.*, 2016 ; Lahcene *et al.*, 2018 ; Mestar *et al.*, 2018).

Les activités biologiques sont attribuées généralement à la richesse des feuilles de l'olivier en plusieurs classes de métabolites secondaires principalement les flavonoïdes, les tanins et les composés terpéniques à savoir : Gaïacol,  $\beta$ -camphor et 4-Propylresorcinol (Fu *et al.*, 2015 ; Hashmi *et al.*, 2015 ; Peschitta *et al.*, 2021 ; Revadi *et al.*, 2021 et Lazarević *et al.*, 2022 ).

Au niveau ultra-structural de la tête et de l'abdomen des adultes de charançons du riz traités par les extraits des feuilles de noyer et d'olivier, il a été remarqué des lésions étendues des cellules neurosécatoires indiquant l'effet cytotoxique avec des noyaux pycnotiques, une chromatine épaisse et un cytoplasme transparent (Kozik et Gramza, 1980 ; Richardson *et al.*, 2020).

Les perturbations engendrées par les extraits au niveau de la tête et l'abdomen peuvent être dues à une interférence potentielle avec la régulation enzymatique et hormonale du processus de développement de l'insecte. Des recherches plus approfondies sur le mécanisme d'action et les cibles moléculaires des composants bioactifs dérivés de plantes médicinales chez diverses espèces de moustiques et d'insectes permettront de découvrir un large éventail d'insecticides potentiels (Sutthanont *et al.*, 2022). En outre, cette étude de laboratoire représente le premier cas où les extraits flavonoïques et tanniques des feuilles de *J. regia* L. et *O. europaea* var *rougette* auraient présenté les niveaux les plus élevés de toxicité contre *S. oryzae*, accompagnés d'effets histologiques prononcés.

### IV.4. Conclusion

De ce qui précède, nous concluons que les extraits de feuilles de noyer commun et d'olivier cultivé utilisés dans nos essais affectent significativement la survie des adultes de *S. oryzae* ainsi que la structure de la tête et l'abdomen.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre étude a permis d'apporter une contribution à la valorisation des feuilles de noyer et d'olivier et de fournir un ensemble d'éléments qui pourraient servir d'appui pour trouver des alternatives à l'usage des produits chimiques pour faire face à deux bio-agresseurs potentiels du blé tendre dans les stocks : les champignons filamenteux et le charançon du riz.

L'objectif principal de ce travail était de rechercher et d'identifier des molécules issues des feuilles de deux arbres fruitiers Noyer et Olivier cultivés en Algérie. et d'étudier leurs pouvoir antifongique vis-à-vis des champignons isolés du blé tendre stocké ainsi que leurs pouvoir insecticide contre un insecte de denrées stockée *Sitophilus oryzae*, Dans ce contexte, le travail est divisé en trois grandes parties : phytochimique, mycologique et entomologique.

Dans la partie phytochimique, deux types d'extractions ont été appliquées sur les feuilles, la première pour obtenir des composés flavonoïques et une deuxième pour acquérir des composés tanniques. Au total 7 extraits ou fractions ont été récupérées de chaque plante.

Les extraits obtenus ont fait l'objet de plusieurs dosages spectrophotométriques (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tanins hydrolysables et tanins condensés), ainsi que des analyses chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse : CGMS et LCMS/MS. Au total plus de 80 molécules ont été identifiées dans l'ensemble des extraits, ces molécules appartiennent aux différentes familles de métabolites secondaires principalement : des composés terpéniques, des flavonols, flavanols, des acides gras, alcanes, alcools et des esters.

Dans le deuxième axe de ce travail, plusieurs isolements ont été effectués à partir du blé tendre stockés issus de différentes régions de l'Algérie (Relizane, Blida, Tizi Ouzou, Constantine, M'sila et Batna). Ces isolements ont permis de recenser au total 282 isolats fongiques. L'identification macro et microscopique nous a permis d'attribuer ces isolats fongiques aux genres suivants : *Aspergillus*, *Penicillium* (*Talaromyces*), *Mucor*, *Rhizomucor*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Fusarium*, *Trichoderma* et *Verticillium*. Avec une dominance du genre *Aspergillus* suivi par le genre *Penicillium* avec une fréquence de 29.78% et 23.05% respectivement.

En raison de la forte similitude entre les espèces, les caractéristiques morphologiques ne permettent pas une identification précise. Par conséquent, nous avons entrepris l'identification de quelques isolats d'*Aspergillus* spp. en séquençant l'ADN des régions des espaceur transcrits internes 1 et 4 (ITS1 et ITS4) de l'ADNr. Cette démarche a permis d'identifier deux souches attribuées à deux espèces différentes, notamment *A. niger* (Asp2) et

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

*A. sclerotiorum* (Asp1). Les isolats de *Penicillium* spp. (*Talaromyces* spp.) ont été identifiés en séquençant l'ADN des régions  $\beta$ -tubuline (Bt2a et Bt2b) de l'ADNr, révélant deux souches correspondant à *T. funiculosus* (Pen3) et *P. chrysogenum* (Pen2).

Par ailleurs, l'évaluation de l'effet antifongique des extraits de feuilles de noyer et d'olivier cultivé contre les souches fongiques représentant les deux genres dominants a été effectué sur deux types de milieux de culture PDA et SWA a fait ressortir un effet inhibiteur significatif sur la croissance mycélienne et la germination des souches fongiques principalement pour les extraits tanniques (TNJ et TNO).

Dans le dernier axe de cette thèse, une étude de l'activité insecticide des extraits de feuilles de noyer et d'olivier cultivé a été évaluée vis-à-vis des adultes du charançon du riz (*Sitophilus oryzae*). Dans les essais de toxicité, trois concentrations ont été utilisées à savoir : 75, 315 et 625  $\mu\text{g/ml}$ . Les résultats obtenus marquent une efficacité intéressante de nos extraits. Les extraits EPJ, BTJ, EPO et AEO ont révélé plus d'efficacité avec un taux de mortalité totale de 100% uniquement après 6 jours de traitement avec la plus grande concentration (625 $\mu\text{g/ml}$ ). L'analyse Probit confirme le fort potentiel entomocide de ces extraits (EPJ, BTJ, EPO et AEO) avec des valeurs de  $DL_{50}$ ,  $DL_{90}$ ,  $TL_{50}$  et  $TL_{90}$  les plus faibles révélant la sensibilité des adultes de charançon du riz.

L'étude histologique des adultes traités par la  $DL_{50}$  des extraits EPJ, BTJ, EPO et AEO a confirmé la toxicité de ces derniers par rapport aux structures tissulaires et cellulaires de l'insecte. Nous avons signalé la présence de modifications et de détériorations de certaines structures telles que la disparition de la lumière intestinale et la dégénérescence des cellules neurosecétrices.

Au terme de cette étude et à la lumière des résultats trouvés, nous pouvons conclure d'une façon concordante que nos objectifs sont atteints et nous préconisons l'utilisation des extraits de feuilles de *J.regia* L. et *O.europaea* var rougette dans le domaine de la sécurité alimentaire et plus précisément, dans la lutte préventive contre les champignons et les insectes de denrées stockées.

**Par ailleurs, nos résultats éclairent de nombreuses perspectives et voies de recherche intéressantes, notamment:**

- ✓ Isolement et purification des molécules majoritaires présentent dans les extraits de deux plantes étudiées.

## *CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES*

- ✓ Mettre une évidence une bio formulation à base des extraits ou de molécules les plus efficaces.
- ✓ Tester la capacité des souches isolées à produire des mycotoxines et la possibilité que les extraits puissent réduire cette production.
- ✓ Tester l'effet des extraits sur la reproduction et d'autres fonctions physiologiques chez les insectes de stocks.
- ✓ Purification de quelques molécules majoritaires et tester leurs effet antifongique et insecticide en étudiant leur interaction et synergisme.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Achoub H., (2018).** Etude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales Algériennes : *Thymus ciliatus* (Desf) (Lamiaceae) et *Asteriscus graveolens* (Forsk.) Dc. (Asteraceae). These de doctorat en chimie organique, Université frères Mentouri Constantine 1.

**Abbott, W. S. (1925).** A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. Journal of Economic Entomology, 18(2), 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>

**Abdelly C. (2008).** Phenol composition of *cynara cardunculus* L. Organs, and their biological activities. Comptes rendus biologiques. Vol 331. p.372-379.

**Ahmad, T., Taous, K., Tahira, T., Alqahtani, Y.S., Mahnashi, M.H., Alyami, B.A., Alqarni, A.O., Alasmery, M.Y., Almedhesh, S.A., and Abdul Jabbar Shah, A.J. (2022).** "Juglone from Walnut Produces Cardioprotective Effects against Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in SD Rats" Current Issues in Molecular Biology 44, no. 7: 3180-3193. <https://doi.org/10.3390/cimb44070220>

**Ahmad, R., Hassan, S., Ahmad, S., Nighat, S., K. Devi, Y., Javeed, K., Hussain, B. (2022).** Stored Grain Pests and Current Advances for Their Management. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.101503

**Aidani H. (2015).** Effet des attaques de capucin des grains (*Rhizopertha dominica*) sur les céréales stockées. « Estimation sur la perte pondérale et le pouvoir germinatif .Cas de blé dur dans la région de Tlemcen » :Thèse de doctorat: Production et Amélioration des plantes. Algérie: Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

**Aikawa, Y. (2002).** Topical preparations containing mango seed kernel oils. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 2002, 5, JP20002322074. [Google Scholar]

**Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono T, Iwatsuki, K. (2001).** Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2001 Oct;48(4):487-91. <http://doi.org/10.1093/jac/48.4.487>. PMID: 11581226.

**Akhtar, M.F., Ashraf, K.M., Saleem, A., Sharif, A., Zubair, H.M., Anwar, F. (2022).** Antidiabetic Potential and Antioxidant Activity of *Olea europaea* subsp. *Cuspidata* (Indian

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Olive) Seed Extracts. Evid Based Complement Alternat Med. 2022 Sep 30; 2022:5164985. <https://doi.org/10.1155/2022/5164985>. PMID: 36217432; PMCID: PMC9547684.

**Ali-Delille L.,(2010).** Les plantes médicinales d'Algérie » Edition Berti 2010 Alger.239p, p.6-181.

**Amar Z., 1995:**« Ibn al-Baytar and the study of the plants of AL-sham journal Qatedrah le – toldot Eresyisra el-we yissubah, n° 76, pp; 49-76.

**Arnal b., Schnebelen , Goetz p., Paris M., (2009).** Phytothérapie : la santé par les plantes médicinales » Edition :VIDAL selection du Reader's Digest 2009 Canada..P 447,pp167

**Alkuwari A., Hassan Z.U., Zeidan R., Al-Thani R., Jaoua S.(2022).** Occurrence of Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Cereals and Application of Yeast Volatiles for Their Biological Control. Toxins. 2022;14:404. doi: 10.3390/toxins14060404. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

**Alexéev V.,(1980).** Analyse qualitative. 4ème édition

**Ali, S.I., Gopalakrishnan, B., Venkatesalu, V. (2017).** Larvicidal potential of *Juglans regia* male flower against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Nat Prod Res. 2017 May;33(10):1463-1466. doi: 10.1080/14786419.2017.1416374. PMID: 29251995.

**Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015).** Histological Stains : A Literature Review and Case Study. Global Journal of Health Science, 8(3), 72. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>

**Amadi, j.E.Adeleke, e.E., olahan, g., garuba,t. And adebola, m.O.(2014).** Effect of plant extracts on sporulation and spore germination of stored melon seed fungi. Int. Journal of research granthaalayah 1(iss.1):21-29 <http://www.Granthaalayah.Com>. International Journal of Research - GRANTHAALAYAH.Vol 1. p.21-29.

**Amaral, J.S., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentao, P., Pereira, J.A., Ferreres, F., (2004).** Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves, Food Chemistry (2004) 373-379.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.055>

**Aouadi, S., Kadri, A., & Ben Younes, S. (2023).** Phytochemical profiling, antimicrobial, antibiofilm, insecticidal, and anti-leishmanial properties of aqueous extract from *Juglans regia*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

L. root bark: In vitro and in silico approaches. 2023. International Journal of Food Properties, 26:1, 1079-1097, DOI: 10.1080/10942912.2023.2200561

**Arunmozhi Balajee, S., Rui, K, Baddley, J.W., Moser, S.A., Marr, K.A., Alexander, B.D., Andes,D., Kontoyiannis,D.P., Perrone, G., Peterson, S., Brandt, M.E., Pappas, P.G., Chiller, T. (2009).** Molecular Identification of Aspergillus Species Collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. ASM Journals.Journal of Clinical Microbiology.Vol. 47, No. 10.2009

**Atalla S., Mohamed Hassanein, N., El-Beih, A., Abdel-ghany, Y. (2003).** Mycotoxin production in wheat grains by different aspergilli in relation to different relative humidities and storage periods.Food Nahrung .Vol 47. p.6-10.

**Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M., & Ghigo, J. M. (2015).** Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. FEMS Microbiol. Rev. 39, 222–233. doi: 10.1093/femsre/fuu013.

**Apostolis, A., Mavros, P., Nikolaou, P.E., Mitakou, S., Halabalaki, M., Skaltsounis, L. (2020).**Phytochemical analysis of olive flowers' hydroalcoholic extract and in vitro evaluation of tyrosinase, elastase and collagenase inhibition activity.Fitoterapia 143 (2020) 104602; <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104602>

**Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx ,M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittelforschung. 1996 Nov;46(11):1086-9. PMID: 8955870.

**Bartali E. H. (1987).** Underground storage pits in Morocco. Tunnelling and underground space technology, 2(4), 381-383.

**Bartali H., Lamzouri J. (1990).** Straw-reinforced clay silos. In International working conference on stored-product protection, Bordeaux (France), 9-14p

**Bätrels A., (1998).**Guide des plantes du bassin méditerranéen » Edition Eugen Ulmer, Paris France ,pp 346 ,P400 .

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Becquey J.,(1997).** les guides des sylvicultures les noyers a bois » Edition Institut pour le développement forestier Paris ,France p15-25

**Bekkis S, (2023).** Quelle stratégie pour l'atténuation de la dépendance alimentaire de l'Algérie des marchés externes ? Cas des blés. Thèse de doctorat, Ecole supérieure de sciences agronomiques( ENSA) El Harrach, Algérie.

**Bekkar, A. A. (2015).** Pouvoir antagoniste et mode d'action du Trichoderma vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes (Doctoral dissertation, Université Mustapha Stambouli de Mascara, Département de Biologie).

**Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. (2004).**Influence of water activity and temperature on growth of aspergillus section nigri strains isolated from grapes. International journal of food microbiology. Vol 96. p.19-27.

**Bennacer, A., Cherif, S.H., 2017.** Contribution to the ethnobotanical, phytochemical, antimicrobial and antioxidant study of the leaves' aqueous extract of the common walnut *Juglans regia* L. Int. J. Pharmacol. Phyto Ethnol. 7, 41–52

**Bennacer, A., Cherif, H.S., Eswayah, A., Abdennour, A.M., Oliveira, I.V., (2021).** Evaluation of the anti-inflammatory, antispasmodic and healing effects of walnut leaves *Juglans regia* L. aqueous extract. AJMAP V7 (1), 123–140.

**Berthier, J., Valla, G. (1998).** Moisissures - mycotoxines et aliments : Du risque à la prévention. Université Claude Bernard, Lyon.p. 05-20.

**Bhat, A.A., Shakeel, A., Rafiq, S., Farooq, I., Malik, A.Q., Alghuthami, M.E., Alharthi, S., Qanash, H., Alharthy, S.A.(2023).** *Juglans regia* Linn.: A Natural Repository of Vital Phytochemical and Pharmacological Compounds. Life 2023, 13, 380.<https://doi.org/10.3390/life13020380>

**Bonev I., (1973).** Note Technique sur le noyer, production des plantes gréffés et creation des noyeraias »Edition : Bibliothèque Forestière .Alger.31

**Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., Hrnčič, M.K.(2020).** Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. Molecules. 2020 Dec 15;25(24):5946.<https://doi.org/10.3390/molecules25245946>. PMID: 33334001; PMCID: PMC7765412.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Botton B, Bretton A, Fever M, Gautier S, Guy P, Larpent JP, Reymond P, Sanglier J, Vayssier Y, Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson, Paris.p.512.
- Bou Abdallah, I., Baatour, O., Mechrgui, K., Herchi, W., Albouchi, A., Chalghoum, A., Boukhchina, S., (2016).** Essential oil composition of walnut tree (*Juglans regia* L.)'leaves from Tunisia. J. Essent. Oil Res. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1166157>.
- Bouchonnet, S. et Libong, D.(2004).** Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse l'actualité chimique - mai 2004 - n° 275 Recherche et développement 7
- Boudreau, A., Germain, M. (1992).** Le blé : Eléments fondamentaux et transformation. Presses de l'Université LAVAL Paris.p.439.
- Brás, S., Sabino, R., Laureano, A., Simões, H., Fernandes, C., Marques-Pinto , G., Cardoso , J., Veríssimo, C.(2015).** Cutaneous infection by different *Alternaria* species in a liver transplant recipient. Medical Mycology Case Reports 8 (2015) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.01.004>
- Bruneton, J., (1999).** Pharmacogosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Technique & Documentation. Lavoisier, Paris, p. 348.
- Bullitta, S., Piluzza, G., Viegi, L.(2007).** Plant resources used for traditional ethno-veterinary phytotherapy in Sardinia (Italy).2007 404 Genetic Resources and Crop Evolution, 54 (7), 1447-1464.
- Cirilli, M., Bellincontro, A., Urbani, S., Servili, M., Esposto, S., Mencarelli, F., Muleo, R. (2016).**On-field monitoring of fruit ripening evolution and quality parameters in olive mutants using a portable NIR-AOTF device. Food Chem 199:96–104
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., DE Gentile, L., Bruns, S., Cimon, B., Penn, P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical.Cahier de formation n°25, Bioforma.p.157-159.
- Chaves, M.S., Martinelli, J.A., Wesp-Guterres, C., Graichen, FAS., Brammer, SP., Scagliusi, SM., Consoli, L., (2013).** The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat. Food Secur. 5(2), 157-176.
- Champion, R. (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences.Quae.INRA.43-56,398.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chandrakala, A., Chandrashekar, S.C., Jyothi, G., & Ravikumar, B.M. (2012).** Effect of cell-free culture filtrates of bio-control agents on the spore germination and infection by *Phytophthora infestans* causing late blight of potato. G.J. B.A.H.S, 1(2): 40-45.
- Clodoveo, M.L., Crupi, P., Annunziato, A., Corbo, F.(2021).** Innovative Extraction Technologies for Development of Functional Ingredients Based on Polyphenols from Olive Leaves. Foods. 2021 Dec 31;11(1):103. <https://doi.org/10.3390/foods11010103>. PMID: 35010227; PMCID: PMC8750173.
- Codex stan 199-1995.** Norme codex pour le blé et le blé dur.
- COI., (2013).** Fiche technique sur La Teigne de l'olivier.11pp
- Cordova-Lopez, J,A. (1998).** Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Orstom, 1998, centre de Montpellier. Thèse de doctorat.
- Cosmulescu, S., Niculina, S., Trandafir,I., Gheorghe Achim, B. O. T. U., Adrian Baciu,M., Gruia, M.(2010).** Phenolics of green husk in mature walnut fruits, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca (2010) 53-56. <https://doi.org/10.15835/nbha3814624>
- Dabire, T.G., Sch'emaenza Bonzi, S., Somda, I., Legreve, A., (2016).** Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., *Eclipta alba* (L.) Hassk. And *Portulaca oleracea* (L.) aqueous extracts against the main seed-borne fungi of Onion(*Allium cepa* L.). Burkina Faso Int. J. Innovat. Appl. Stud. 17 (3), 804–812. Aug. 2016. <http://www.ijias.issr-journals.org/>.
- Da Cruz Cabral, L., Delgado, J., Patriarca, A., Rodríguez, A.(2019).** Differential response to synthetic and natural antifungals by *Alternaria tenuissima* in wheat simulating media: Growth, mycotoxin production and expression of a gene related to cell wall integrity. Int J Food Microbiol. 2019 Mar 2; 292:48-55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.005> Epub 2018 Dec 7. PMID: 30572265.
- Davis, N.D., Diener, U.L. (1987).** Mycotoxins, in: Food and Beverage Mycology, Food microbiology vol 11.
- Delaviz, H., Jamshid M., Ghasem G., Bahram M., and Farhadi,N.(2017).** A review study on phytochemistry and pharmacology applications of *Juglans regia* plant, Pharmacognosy reviews (2017) 145. [10.4103/phrev.phrev\\_10\\_17](https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_10_17)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Delimi, A., Taibi, F., Bouchelaghem, S., Boumendjel, M.E., Hennouni- Siakhène, N., Chefrou, A.(2017).** Chemical composition and insecticidal activity of essential oil of *Artemisia herba alba* (Asteraceae) against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Int J Biosci.* 2017 ; 10(2) :130-137.
- Deligeorgakis, C., Magro, C., Skendi, A., Gebrehiwot, H.H., Valdramidis, V., Papageorgiou, M.(2023).**Fungal and Toxin Contaminants in Cereal Grains and Flours: Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods.* 2023 Nov 29;12(23):4328. doi: 10.3390/foods12234328. PMID: PMC10706277.
- De la Ossa, J.G., Felice, F., Azimi, B., Salsano, J.E., Digiacomio, M., Macchia, M., Danti, S., Di Stefano, R.(2019).** Waste Autochthonous Tuscan Olive Leaves (*Olea europaea* var. *Olivastraseggianese*) as Antioxidant Source for Biomedicine. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov25;20(23):5918. <https://doi.org/10.3390/ijms20235918>. PMID: 31775339; PMID: PMC6928929.
- Demain, A.L., Fang, A.(2000).** The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2000;69:1-39. doi: 10.1007/3-540-44964-7\_1. PMID: 11036689.
- De Groot, I. (2004).** AD18F Protection des céréales et des légumineuses stockées. Agromisa Foundation, p 20.
- Deschepper, R.(2017).** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie, These de doctorat en sciences pharmaceutiques. 2017. ffdumas-01515314f.
- Djenane, D., Gómez, D., Yangüela, J., Roncalés, P., Ariño, A.(2018).** Olive Leaves Extract from Algerian Oleaster (*Olea europaea* var. *sylvestris*) on Microbiological Safety and Shelf-life Stability of Raw Halal Minced Beef during Display. *Foods.* 2018 Dec 26;8(1):10. <http://doi.org/10.3390/foods8010010>. PMID: 30587798; PMID: PMC6352275.
- Djeugap Fovo J, Fontem, D.L., Tapondjou A. (2011).**Efficacité in vitro et in vivo des extraits de plantes contre le mildiou (phytophthora infestans) de la morelle noire.*Int J Biol Chem Sci.*Vol 5. p.2205-2213.
- Djoudad-kadji, H., Benslimane, S., Chevalier, C., Kadji, B., Exbrayat, J.-M., & iguerouada, M. (2011).** Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de barbus callensis variation de fixateurs et de colorants. *Revue française d’histotechnologie*, 24(1), 21-28.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Doumaïndji A., Doumaïndji S., Doumaïndji B. (2003).** Cours de technologie des céréales. Ed. Office des publications Universitaires Ben-Aknoun-Alger ; p 01-20
- Dubcovsky, J., Echaide, M., Giancola, S., Rousset, M., Luo, M. C., Joppa, L. R. and Dvorak, J. (1997).** Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 : 1169- 1180.
- Duron, B.S. (1999).** Le transport maritime des céréales. Mémoire de d.E.S.S. Université d'Aix-Marseille.p.81.
- Dupin Henri,Cuq Jean-Louis, Malewiak M.I ,Leynaud-Rouaud C, Berthier A.M. (1992).** Alimentation et nutrition humaines. EFS Editeur .p.1533.
- Dvorak, J., Luo, M.C., Yang, Z.L., and Zhang, H.B. (1998).** The Structure of *Aegilops tauschii* Genepool and the Evolution of Hexaploid Wheat, *Theor.Appl. Genet.*, 97(4): 657–670.
- Debuigne .G,Couplan.F., (2006).** Petit Larousse des plantes qui guérissent » Edition larousse 2006 paris France p 74-618 pp 896.
- Deville A., (1828).**Fables anthologiques, ou les fleurs mises en action » Edition :Francois louis libraire,pp145.
- Di Ilio, V., Cristofaro, M. (2021).** Polyphenolic extracts from the olive mill wastewater as a source of biopesticides and their effects on the life cycle of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Int J Trop Insect Sci* 41, 359–366 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00224-6>
- Duke J A., (2004).** Green pharmacy » Edition Jarir Bookstore KSA ( L'arabie saoudite) p428
- Dupérat M. et Polese J M.,(2008)** Encyclopédie visuelle des arbres et des arbustes, Edition :Artémis 2008 France.p124-133.
- El Hafid Abu-abdiallah Mohammed Ibn Ahmed El Dhahabi ,(1990)** «الطب النبوي» El-Tib Ennabaoui » الطبعة الثالثة» بيروت لبنان الطبعة الثالثة» دار احياء العلوم بيروت لبنان pp97-98. P328.
- Ellafi, A., Farhat, R., Snoussi, M., Emira Noumi, E., Anouar, EH., Ben Ali, R., El May, M.V., Sayadi, S., Aouadi, K., Kadri, A. Ben Younes, S.(2023).** Phytochemical profiling, antimicrobial, antibiofilm, insecticidal, and anti-leishmanial properties of aqueous extract from *Juglans regia* L. root bark: In vitro and in silico approaches. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2023.2200561> <http://hdl.handle.net/10576/44042>



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Elhrech, H.; Aguerd, O.; El Kourchi, C.; Gallo, M.; Naviglio, D.; Chamkhi, I.; Bouyahya, A.(2024).** Comprehensive Review of *Olea europaea*: A Holistic Exploration into Its Botanical Marvels, Phytochemical Riches, Therapeutic Potentials, and Safety Profile. *Biomolecules* 2024, *14*, 722. <https://doi.org/10.3390/biom14060722>
- Éric Lucas, Jordi Riudavets,(2002).** Biological and mechanical control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice, *Journal of Stored Products Research*, Volume 38, Issue 3, 2002, 293-304, [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(01\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(01)00033-9).
- Elshafie, H.S., Camele, I., Mohamed, A.A.(2023).** A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(4):3266. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
- Ercisli, S., Esitken, A., Turkkal, C., Orhan, E.(2005).** The allelopathic effects of juglone and walnut leaf extracts on yield, growth, chemical and PNE compositions of strawberry cv. Fern. 2005. *Plant soil environ.*, 51, 2005 (6): 283–287
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C.(2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol*. 2008 May;331(5):372-9. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.02.008>. Epub 2008 Mar 17. PMID: 18472083
- F.A.O. (1984).** Perte de la qualité des grains alimentaire récolte. *Etude FAO Alimentation et Nutrition*.p.165.
- FAO (2015).** The State of Food Insecurity in the World,FAO, Rome, Italy, pp.1e56.
- FAO (2019).** World food and agriculture, Statistical Pocketbook, FAO, Rome, Italy,pp.254.
- FAO (2021).** World food and yield, Statistical Pocketbook,FAO,Rome, Italy, pp123.
- Feillet, P. (2000).** Le grain de blé : Composition et utilisation.INRA.Paris.55-75,154.
- Fincheira, P., Parada, M., & Quiroz, A. (2017).** Volatile organic compounds stimulate plant growing and seed germination of *Lactuca sativa*. *J. Soil Sci. Plant Nutr*. 17, 853–867.
- Fu, J.T., Tang, L., Li, W.S., Wang, K., Cheng, D.M., Zhang, Z.X.(2015).** Fumigant Toxicity and Repellence Activity of Camphor Essential Oil from *Cinnamomum camphora* Siebold

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Against *Solenopsis invicta* Workers (Hymenoptera:Formicidae). J Insect Sci. 2015 Sep 21;15(1):129. doi: 10.1093/jisesa/iev112. PMID: 26392574; PMCID: PMC4664941.

**Gabe, M., (1968).** Techniques histologiques. Masson et Cie, pp 1113.

**Gacem, M.A., Ould El Hadj, K.A., Gacemi B. (2012).** Étude de la qualité physicochimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (oaic) de la localité de saida (algérie). Alg J Env.p.67-76.

**Gibka, A.J., Styczynska, K.,Glinski, M. (2009).** Antimicrobial activity of undecan-3-one, undecan-3-ol and undec-3-yl acetate. Centr Eur J Immunol 34:154–157

**Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A.H., Saari, N.(2012).** Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-a review. Int J Mol Sci. 2012;13(3):3291-3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>. Epub 2012 Mar 12. PMID: 22489153; PMCID: PMC3317714.

**González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Hadjichambis, A., Houmani. Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., Eljohrig, S. (2008).** Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. Journal Ethnopharmacology. 2008; Mar 5;116(2),341-57. doi: 10.1016/j.jep.2007.11.045

**Gooding., M.J.(2009).** The wheat crop. In: Wheat chemistry and technology.pp23-32;

**Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z.(2018).** Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. Phytochem Rev 17, 1091–1110 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9526-0>

**Guiraud, J.P., (2003).** Microbiologie alimentaire.Dunod.Paris

**Guiraud, J.P., Rosec, J.P.(2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France.300.

**Giura, S., Botu, M., Vulpe, M., Vîjan, L.E., Mitrea, R., (2019).** Evolution of polyphenols, flavonoids, and tannins content in walnut leaves and green walnut husk during growing season. Not Bot Horti Agrobi 47 (4), 1264–1271. <https://doi.org/10.15835/nbha47411460>.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Guptaa, A., Behla, T., Panichayupakaranan, P. (2019).** A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obes. Med.* 16, 100142 <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100142>, 2019.
- Hadj, A.O.E., Sebihi, H., Siboukeur, O. (2001).** Qualité hygiénique et caractéristiques physico-chimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette d'ouargla, mémoire de magister en technologie alimentaire. Université de Ouargla.p.163.
- Haider, N. (2012).** Evidence for the Origin of the B Genome of Bread Wheat Based on Chloroplast DNA, *Turk. J. Agric. For.*, 36: 13–25.
- Haines, C.P., (1997).** Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. III: The use of predators and parasites. *Trop. Stored Prod. Inf.* 48:17-25.
- Hagerman, A.E. (2002).** Hydrolyzable Tannin Structural Chemistry. *Tannin Handbook*. Miami University, Miami, FL, USA.
- Harouak, H., Ibijbijen, J., Nassir, L.(2021).** Chemical profile of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, and *Juglans regia* L. and *Olea europaea* L. var. *Sylvestris* used against oral diseases: in vitro analysis between polyphenolic content and aqueous extraction optimization. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07118>. *Heliyon*7(2021)e07118.
- Hould, René., & de Shawinigan, C. (1994).** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Direction générale des moyens d'enseignement, Centre collégial de développement de matériel didactique.
- Hubert, S., Grzegorz, C., Czerniewicz, P., Bogumił, L., Iwona, S., Krzyżanowski, R., Henryk Matok, H. (2015).** Antifungal activity of *Juglans regia* (L.) leaf extracts against *Candida albicans* isolates. *Pol. J. Environ. Stud.* 24, 1339–1348.
- Huchet, J.B., (2016).** Le Coléoptère, la Graine et l'Archéologue : Approche archéoentomologie des principaux ravageurs des denrées stockées. Plantes, produits végétaux et ravageurs Actes des X<sup>e</sup> Rencontre d'Archéobotanique, les Eyzies de Tayac, 24-27 september 2014, pp. 17-42
- Husein, A.I., Al-Nuri, M.A., Zatar, N.A., Jondi, W., Ali-Shtayeh, M., Warad, I.(2012).** Isolation and antifungal evaluation of *Juglans regia* L. extracts. *IJRRAS* 2, 13.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hu, N., Li, W., Du, C., Zhang, Z., Gao, Y., Sun, Z., Yang, L., Yu, K., Zhang, Y., EA., (2001).** Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol.* 125, 1198–1205. doi: 10.1104/pp.125.3.1198
- Iqbal, M.J., Shams, N., Fatima, K.(2022).** Nutritional quality of wheat In: Ansari MR, editor. *Wheat*. London: Intech Open; (2022) [Google Scholar]
- Jagadeesan, R., Collins, P.J., Darglish, G.J., Ebert, P.R., Schlipalius, D.I.(2012).** Phosphine resistance in the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae): Inheritance, gene interactions and fitness costs. *PLoS ONE* 2012, 7, 2012.
- Jemai H, Feki AEL, Sayadi S (2009)** Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxandiabetic rats. *J Agric Food Chem* 57:8798–8804
- Jakopič, J., Veberič, R., Štampar, F., (2009).** Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agric. Slov.* 11, 93, 1.
- Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M-H., Journet, M. (1995).** *Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion*. Inra. Paris.921p. Quae
- Junxi liu Min Meng Chen li Xinyi Huang Duolong Di,(2008).** Simultaneous determination of three diarylheptanoid and an alfa-tetralone derivative in the green walnut husks *juglans regia* L by high performance liquid chromatography with photodiode array detector» *Journal of chromatography A*,1190 ( 2008)80-85 China
- Kazeminejad, Z., Marzi, M., Shiroudi, A., Kouhpayeh, S.A., Farjam, M., Zarenezhad, E.(2022)** Novel 1, 2, 4-Triazoles as Antifungal Agents. *Biomed Res Int.* 2022 Mar 22;2022:4584846. doi: 10.1155/2022/4584846. PMID: 35360519; PMCID: PMC8964166.
- Karanja, E., Boga, H., Muigai, A., Wamunyokoli, F., Kinyua, J., Nonoh, J. (2012).** Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected novel *Streptomyces* species isolated from selected Kenyan national parks. In: *Scientific conference proceeding*
- Khan H., Ahmad, W., Hussain, I., Imran, M., Afridi, M.S., Ullah, S.(2020).** Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of leaves of *Olea europaea* wild variety. *Journal of Food Measurement and Characterization*.2020;14:640–648. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00310-5>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khan, M.I.R., Poor, P. & Janda, T. (2022).** Salicylic Acid: A Versatile Signaling Molecule in Plants. *J Plant Growth Regul* 41, 1887–1890 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10692-4>
- Kheirkhah, M., Ghasemi, V., Yazdi, A.K., Rahban, S.(2015).** Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from *Ziziphora clinopodioides* Lam. used against the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *J Plant Prot Res.* 2015, 55(3): 260-265.
- Kierszenbaum, A. L. (2006).** Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique. De Boeck.
- Kihara, H. (1944).** Discovery of the DD\_Analyser, One of the Ancestors of *Triticum vulgare*. *Agric. Hort.*, 19: 13–14
- Kirouani, A., Kiar, RO., Boukhalfoun, L., Fellahi, ZEA., (2019).** Caractérisation de quelques variétés Algériennes de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. durum) par le biais des marqueurs phénotypiques. *J Appl Bioscie.* 142 (1), 14464-14477.
- Kocaçaliskan, I. and Terzi, I. (2001).** Allelopathic effect of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. *Journal of Horticultural science and Biotechnology*,76(4) 436-440.
- Kozik, M.B., Gramza, G.(1980).** Histochemical changes in the neurosecretory hypothalamic nuclei as result of an intoxication with mercury compounds. *Acta Histochem Suppl.* 1980;22:367-80. German. PMID: 6265974.
- Lahcene, S.,Taibi, F.,Mestar, N.,Ali Ahmed, S.,Boumendjel, M.,Ouafi, S., Karim Houali, K., (2018).**Insecticidal effects of the *Olea europaea* subsp. laperrinei extracts on the flour Pyralid *Ephestia kuehniella*; *Cellular and Molecular Biology*, (Noisy le Grand) 2018 | Volume 64 | Issue 11. Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.11.2>.
- Lahouar, A. (2016).** Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en tunisie : Incidence et profils écophysiologiques. Institut supérieur de biotechnologie de monastir.p.21-25.
- Lakhial S. (2018).** Inventaire des insectes et des maladies des denrées stockées. Thèse de doctorat. Université de Bouira. p 6-8.
- Laurent C., Maxime F., Mazé A., Tichit M. (2003).** Multifonctionnalité de l'agriculture et modèles de l'exploitation agricole. *Économie rurale.* 273(1), 134-152.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Lasseran N., Monroco. (1988).** Guide pratique-stockage et conservation des grains à la ferme. Ouvrage réalisé par l'ITCF, institut des céréales et des fourrages Wilson-75116-paris- France. p17.

**Lazarević, J., Kostić, I., Šešlija Jovanović, D., Čalić, D., Milanović, S., Kostić, M.(2022).** Pure Camphor and a Thujone-Camphor Mixture as Eco-Friendly Antifeedants against Larvae and Adults of the Colorado Potato Beetle. *Plants* 2022, 11, 3587. <https://doi.org/10.3390/plants11243587>

**Le Bars J, Le Bars P. (1987).** Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Paper presented at: Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées". cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l' Institut Pasteur, 4e trimestre 1987; Toulouse.

**Lee, S.B., and Taylor. J.W. (1990).** Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287 in M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.

**Lee, B.-H., Annis, P. C., Tumaalii, F. et Choi, W.-S., (2004).** Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored grain insects. *Journal of Stored Products Research*, 40(5), 553-564.

**Lee, J. Y., Woo, R. M., Choi, C. J., Shin, T. Y., Gwak, W. S., & Woo, S. D. (2019).** *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults shows high conidia persistence and productivity. *AMB Express*, 9(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0933-z>

**Lucas, E. & Riudavets, J. (2002).** Biological and mechanical control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice. *Journal of Stored Products Research*, 38 (3), 293-304.

**MacKey, J. M. (1966).** Species Relationship in Triticum, Proceedings of 2nd International Wheat Genetics Symposium Hereditas, Mac Key, J.M., Ed. Lund: 237-275. In, Haider, N. 2013.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

The Origin of the B\_Genome of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Russian Journal of Genetics,. 49(3): 263–274.

**Marrufo, T., Nazzaro, F., Mancini, E., Fratianni, F., Coppola, R., De Martino, L., Agostinho, A., De Feo, V. (2013).** Chemical composition and bioactivity of the essential oil from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Mozambique. *Molecules* 18(9):10989-11000.

**Maleita, C., Esteves, I., Braga Mara, E. M., Figueiredo, J., Gaspar Marisa C., Abrantes, I., Sousa Hermínio C. de.(2022).** Juglone and 1,4-Naphthoquinone—Promising Nematicides for Sustainable Control of the Root Knot Nematode *Meloidogyne luci* *Frontiers in Plant Science*V13 2022<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.867803> DOI:10.3389/fpls.2022.867803

**Mahadevappa., Y.(2003).**Biology and Management of Rice Weevil *Sitophilus Oryzae* (Linn) in Maize Grains. Published:2003 Publisher:University of Agricultural Sciences.

**McKevith, B. (2004).** Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29: 111-142.<https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x>

**McFadden, E.S. and Sears, E.R. (2004).** The Artificial Synthesis of *Triticum spelta*, *Rec. Genet. Soc. Am.*, 13: 26–27.

**Mebdoua, S., Ounane, G., (2019).** Evaluation of pesticide residues in wheat grains and its products from Algeria. *Food Addit. Contam. B* 12, 289-295.

**Mediouni Ben Jemâa, J., Tersim, N., Taleb Toudert, K. et Khouja, M. L., (2012).** Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition, *J. Stored Prod. Res.*, 48, 97-104.

**Mestar, N.G.,Boudiaf, M.N., Lahcene,S., Abbaci, H., Aiche, G.I., Metna, B., Saadoun, N.S., Taibi, F., Houali, K., (2018).** Bio-insecticidal effects of Oleaster leaves aqueous extracts against *Psylla* larvae (*Euphyllura olivina*), a primary pest of *Olea europaea* L. *Cellular and Molecular Biology* 2018 | Volume 64 | Issue 15



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Mishra,A., Sharma,P., Kumar Gupta,A., Parveen,F.,Pushpendra,K.(2019).** **Conrol of insect pest through biomolecules and traps.** Chapter book,1<sup>st</sup> edition,Apple academic press, p22.

**Mills, J.T. (1990).** Mycotoxins and toxigenic fungi on cereal grains in western canada. Vol 68.p.982-986.

**Mihailovi, V., Vukori, N., Niforovi, N., Soluji, S., Mladenovi, M., Maskovi, P. (2011).** Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L., *J. Med. Plants Res.* 5(7): 1164-1174.

**Molinié, A., Faucet-Marquis, V., Castegnaro, M., Leszkowicz, A. (2005).** Analysis of some breakfast cereals on the french market for their contents of ochratoxin a, citrinin and fumonisin b1: Development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin a and citrinin. ed. F. Chem.Vol 92.p.391-400.

**Monteiro, A.F., Moura,P., Sousa, N.F., Bezerra, A., Muratov, E., Scotti, M.T., Scotti, L.(2019).**Prediction of antifungal activity, cytotoxicity risks and molecular docking against *Malassezia furfur* of constituents of citronella essential oil (*Cymbopogon winterianus*), in Proceedings of the MOL2NET'19, Conference on Molecular, Biomed., Comput. & Network Science and Engineering, 5th ed., 20 March–20 December 2019, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/mol2net-05-06762

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

**Muhammad Ali Hashmi, Afsar Khan,Muhammad Hanif, Umar Farooq, and Shagufta Perveen.(2015).**Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive) Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015, Article ID 541591, 29 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/541591>

**Nandhini, S.U. (2015).** Gas chromatography–mass spectrometry analysis of bioactive constituents from the marine Streptomyces. *Asi J Pharm Clin Res* 8:244–246.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Nasiry, I., D., Khalatbary, A.R., Ahmadvand, H., Talebpour Amiri, F.B.(2021).** Effects of *Juglans regia* L. leaf extract supplementation on testicular functions in diabetic rats. *Biotech. Histochem.* 2021, 96, 41–47. [Google Scholar] [CrossRef]

**Navale, V., Vamkudoth, K.R., Ajmera, S., Dhuri, V.(2021).** *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. *Toxicol Rep.* 2021 May 2; 8:1008-1030. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.04.013>. PMID: 34408970; PMCID: PMC8363598.

**Nayak, M.K., Collins, P.J., Kopittke, R.A.(2003).** Residual toxicities and persistence of organophosphorus insecticides mixed with carbaryl as structural treatments against three liposcelidid psocid species (Psocoptera: Liposcelididae) infesting stored grain. *J Stored Prod Res.* 2003; 39: 343-353.

**Ndiaye, D.S.B. (1999).** Manuel de stockage et de conservation des céréales et des oléagineux, Coopérative Autrichienne pour le développement, Décolé Sidy Baba, Cellule centrale d'appui technique PADER. 2, 61.

**Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T., Killington, R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. *Berti.* 210-217.

**Nelson, J. H. (1985).** Wheat: its processing and utilization. *American Journal of Clinical Nutrition,* 41: 1070–1076.

**Newman, D.J., Cragg, G.M.(2007).** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 461–477. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

**Nevo, E., Korolm, A. B., Beiles, A., and Fahima, T.(2002).** Evolution of Wild Emmer and Wheat Improvement: Population Genetics, Genetic Resources, and Genome Organization of Wheat's Progenitor, *Triticum dicoccoides*, London. Springer Verlag.

**Olmo-García, L., Kessler, N., Neuweiger, H., Wendt, K., Olmo-Peinado, J.M., Fernández-Gutiérrez, A., Baessmann, C., Carrasco-Pancorbo., A.(2018).** Unravelling the Distribution of Secondary Metabolites in *Olea europaea* L.: Exhaustive Characterization of Eight Olive-

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TreeDerived Matrices by Complementary Platforms (LC-ESI/APCI-MS and GC-APCI-MS). *Molecules*. 2018 Sep 20;23(10):2419. <https://doi.org/10.3390/molecules23102419>. PMID: 30241383; PMCID: PMC6222318.

**Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A.,(2008).** Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J. Food. Chem. Toxicol.* 46, 2326–2331.

**Pantano D, Luccarini I, Nardiello P, Servili M, Stefani M, Casamenti F (2016)** Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill wastewater ameliorate cognitive deficits and neuropathology. *Br J Clin Pharmacol* 83:54–62

**Parrent, C., Capelli, N., Dat, J. (2008).** Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes, *Comptes Rendus Biologies*, Volume 331, Issue 4, 2008, Pages 255-261, <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.001>.

**Parisot, N., Vargas-Chávez, C., Goubert, C. (2021).** The transposable element-rich genome of the cereal pest *Sitophilus oryzae*. *BMC Biol* 19, 241 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01158-2>

**Paudel, P., Satyal, P., Dosoky, N.S., Maharjanb, S., Setzer, W.N., (2013).** *Juglans regia* and *J. nigra*, two trees important in traditional medicine: a comparison of leaf essential oil compositions and biological activities. *Nat. Prod. Commun.* 8 (10), 1481–1486, 2013.

**Peng, K., Jin, L., Niu, Y.D., Huang, Q., McAllister, T.A., Yang, H.E., Denise, H., Xu, Z., Acharya, S., Wang, S., Wang, Y.(2018).** Condensed Tannins Affect Bacterial and Fungal Microbiomes and Mycotoxin Production during Ensiling and upon Aerobic Exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Feb 14;84(5): e02274-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02274-17>. PMID: 29247054; PMCID: PMC5812926.

**Pereira, C.B., Pereira de Sá, N., Borelli, B.M., Rosa, C.A., Barbeira, P.J.S., Cota, B.B., Johann, S.(2016).** Antifungal activity of eicosanoic acids isolated from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Microb Pathog.* 2016 Nov;100:205-212. doi: 10.1016/j.micpath.2016.09.022. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27693577.

**Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., (2007).** Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *J. Toxicol.* 2007 (45), 2287–2295. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.004>.

**Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., and Berthelsen, K. (2006).** Phylogenetic Relationships of Triticum and Aegilops and Evidence for the Origin of the A, B, and D Genomes of Common Wheat (*Triticum aestivum*), *Mol. Phylogenet. Evol.*, 39 (1): 70–82.

**Pitt, I.J., Hocking, A.D.(1997).** *Fungi and Food Spoilage*, S pringer New York, NY, <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

**Pomeranz, Y., Huang, M. and Rubenthaler, G. L. (1991).** Steamed bread. III. Role of lipids. *Cereal Chemistry*, 68: 353-356.

**Pharmacopée européenne, (2015)**, 6eme Edition. Paris 2300 pp.

**Pharmacopée Européenne, (2005)**, 5ème édition. Paris.2130pp.

**Prescott L.M,Harley J.P, Klein D. A, Wiley J.M,Sherwood L.M, Woolverton CJ.(2010).** *Microbiologie*. 3ème Edition. De boeck .p. 1216 .

**Peschiutta, M.L., Achimón, F., Brito, V.D., Pizzolitto, R.P., Julio Alberto Zygodlo, J.A., Zunino, M.P. (2021).** Fumigant toxicity of essential oils against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae): a systematic review and meta-analysis. *Journal of Pest Science* 95:3, pages 1037-1056.Crossref

**Pungitore, C.R., García, M., Gianello, J.C., Sosa, M.E. and Tonn, C.E. (2005)** Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. 41(4), 433-443.

**Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N.(2008).** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *Int J Food Microbiol.* 2008 Feb 29;122(1-2):85-92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.057. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18083262.

**Richardson, J.R., Fitsanakis, V., Westerink, R.H.S., Kanthasamy, A.G.(2019).** Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* 2019 Sep;138(3):343-362. doi: 10.1007/s00401-019-02033-9. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31197504; PMCID: PMC6826260.

**Rees, D., (2007).** *Insects of stored grain : a pocket reference*, 2nd ed, CSIRO Publishing Australia, 77p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Reitveld, W.J. (1983).** Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of chemical ecology*,9, 295-308.
- Revadi, S.V., Giannuzzi, V.A., Vetukuri, R.R.(2021).** Larval response to frass and guaiacol: detection of an attractant produced by bacteria from *Spodoptera littoralis* frass. *J Pest Sci* 94, 1105–1118 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01352-9>
- Rossi, A., Martins, M.P., Bitencourt, T.A., Peres, N.T.A., Rocha ,C.H.L., Rocha, F.M.G., Neves-da-Rocha, J., Lopes, M.E.R., Sanches, P.R., Bortolossi, J.C., Martinez-Rossi, N.M.(2021).** Reassessing the Use of Undecanoic Acid as a Therapeutic Strategy for Treating Fungal Infections. *Mycopathologia*. 2021 Jun;186(3):327-340. doi: 10.1007/s11046-021-00550-4. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33835367.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wie, H.X., Pare, P.W., Kloepper, J.W. (2003).** Bacterial volatiles promote growth of *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci*;100:4927–32.
- Quirantes-Piné,R., Quirantes-Piné,V., VerardoVito, D., Arráez-Román,D., Fernández-Gutiérrez. A., Fernández-Gutiérrez, A.(2012).** Evaluation of different extraction approaches for the determination of phenolic compounds and their metabolites in plasma by nanoLC-ESI-TOF-MSOctober 2012Analytical and Bioanalytical Chemistry 404(10)Follow journalDOI: 10.1007/s00216-012-6402-z
- Sallé J L.,(1991).** le Totum en phytothérapie approche de phytothérapie » Edition Frison-Roche Paris p175 ;pp239
- Sadeghnezhad R, Enayati A, Ebrahimzadeh MA, Azarnoosh M, Fazeli-Dinan M.(2020).** Toxicity and Anti-Feeding effects of Walnut (*Juglans regia* L.) extract on *Sitophilus Oryza* L.(Coleoptera: Curculionidae) *Fresenius Environ Bull*. 2020;29(1):325–31. [Google Scholar]
- Sakhraoui, N., Boussouak, R., Metallaoui, S., Chefrou, A., Hade, A. (2020).** La flore endémique du Nord-Est algérien face à la menace des espèces envahissantes. *Acta Botanica Malacitana* 45 (2020). 67-79 DOI: <http://dx.doi.org/10.24310/abm.v45i0.6138>
- Serra, V., Salvatori, G.,Pastorelli, G.(2021).** Dietary Polyphenol Supplementation in Food Producing Animals: Effects on the Quality of Derived Products. *Animals* 2021, 11,401. <https://doi.org/10.3390/ani11020401>
- Siad, SM., Gioia, A., Hoogenboom, G., Iacobellis, V., Novelli, A., Tarantino, E., Zdruli, P., (2017).** Durum wheat cover analysis in the scope of policy and market price changes: A case study in Southern Italy. *Agriculture*. 7(2):12.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Simpson.W.T, (1999).** Drying and Control of Moisture Content and Dimensional Changes, Gen. Tech. Rep, FPL-GTR-113, Madison, Forest Product Laboratory, p.463.

**Singh, S., Kaur, J., Ram, H., Singh, J., Kaur, S.(2023).** Agronomic bio-fortification of wheat (*Triticum aestivum* L.) to alleviate zinc deficiency in human being. Rev Environ Sci Biotechnol 22, 505–526 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11157-023-09653-4>

**Smith, C. and Wayne, A. (1995).** Crop Production. John Wiley and Sons; 60-62.

**Soltner, D. (2012).** Phytotechnie spéciale : les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies. Sciences et techniques agricoles, 21èmeEdition. Angers.472 p. (Collection Sciences et techniques agricoles).

**Sharma, S.K., Tyagi, P.K., Upadhyay, A.K., Haque, M.A., Mohanty, S.S., Raghavendra, K., Dash, A., (2009).** Efficacy of permethrin treated long-lasting insecticidal netson malaria transmission and observations on the perceived side effects, collateral benefits and human safety in a hyperendemic tribal area of Orissa, India. ActaTrop. 112, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.022>.

**Sharma N, S. Bhandari A. (2014).** Management of pathogens of stored cereal grains. p.87-107.

**Sharma, S.K., Tyagi, P.K., Upadhyay, A.K., Haque, M.A., Mohanty, S.S., Raghavendra, K., Dash, A. (2009).** Efficacy of permethrin treated long-lasting insecticidal nets on malaria transmission and observations on the perceived side effects, collateral benefits and human safety in a hyperendemic tribal area of Orissa, India. Acta Trop. 112, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.022>.

**Shejbal J., DE Boislambert J.N. (1982).** Stockage en atmospheres modifiées. In. Multon JL., conservation et stockages des grains et graines et produits dérivées. Ed .Lavoisier, Paris. p 777.

**Shewry, P.R., Hey, S.J. (2015).** The contribution of wheat to human diet and health. Food Energy Secur. 4, 178–202.

**Slavin, J.L., Martini, M.C., Jacobs, D.R., Marquart, L. (1999).** Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. Am. J. Clin. Nutr. 70, 459 S–463S.

**Sutthanont, N., Sudsawang,M., Phanpoowong, T., Sriwichai, P., Ruangstittichai, J., Rotejanaprasert, C., Srisawat, R.(2022).** Effectiveness of Herba lEssential Oils as Single and

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Combined Repellents against *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Insects* 2022, 13, 658. <https://doi.org/10.3390/insects13070658>

**Surget, A., Barron, C. (2005).** Histologie du grain de blé. *Industrie des céréales*. (145):p.4-7.

**Tabuc, C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat d'université : Pathologie, mycologie, génétique et nutrition. [Toulouse]. L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. p.16-190

**Talal, A., Feda, M.N.(2003).** Plants Used in Cosmetics. *Phytother. Res.* 2003, 17, 987–1000. [Google Scholar]

**Talhaoui, N., Gomez, A.M., Caravaca, C., Roldán-Segura, M., María Roldán-Segura, M., Segura, A., Carretero, S.(2015).** Chemometric Analysis for the Evaluation of Phenolic Patterns in Olive Leaves from Six Cultivars at Different Growth Stages January 2015 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(6) Follow journal DOI: 10.1021/jf5058205

**Tirichine, A., Madani, H., Benlamoudi, W., Attali, Y., Allam, A.(2015).** Evaluation agromorphologique des cultivars locaux de blé dur *Triticum durum* Desf. cultivés dans les palmeraies de la vallée d'Oued Righ (Sud- Est algérien). *RBR*. 2 (5), 67- 76.

**Top, S.M., Preston, C.M., Dukes, J.S., Tharayil, N.(2017).** Climate Influences the Content and Chemical Composition of Foliar Tannins in Green and Senesced Tissues of *Quercus rubra*. *Front Plant Sci.* 2017 May 16; 8:423. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00423>. PMID:28559896; PMCID: PMC5432568.

**Touchan, R., Kherchouche, D., Oudjehih, B., Touchan, H., Slimani, H., M.Meko, H.(2016).** Dendroclimatology and wheat production in Algeria. *J. Arid Environ.* 124, 102–110.

**Van Slageren, M. W. (1994).** Wild Wheats: A Monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae): A Revision of All Taxa Closely Related to Wheat, Excluding Wild *Triticum* Species, with Notes on Other Genera in the Tribe Triticeae, Especially *Triticum*, Wageningen: Wageningen Agric. Univ.

**Vermerris, W., Nicholson, R., (2006).** Isolation and Identification of Phenolic Compounds *Biochemistry*. Springer, Dordrecht, pp. 35–62, 151–191.

**Vivaldo, G., Masi, E., Taiti, C.(2017).** The network of plants volatile organic compounds. *Sci Rep* 7, 11050 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10975-x>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang, Z., (2021).** Predicting micronutrients of wheat using hyperspectral imaging. *Food Chem.* 343, 128473.
- Wang, Yn., Wang, Hx., Liu, Yb., Shi, Gl. (2012).** Insecticidal Activity of *Juglans regia* Extracts against *Tetranychus cinnabarinus* and Their Effects on Relative Enzymes Activity in *Tetranychus cinnabarinus* . In: Zhu, E., Sambath, S. (eds) *Information Technology and Agricultural Engineering. Advances in Intelligent and Soft Computing*, vol 134. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27537-1\\_75](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27537-1_75)
- Waines, J. G. and Barnhart, D. (1992).** Biosystematic research in *Aegilops* and *Triticum*. *Hereditas*, 116: 207-212.
- Wei X, Cui S, Xie Y.(2022).** Synthesis and Antibacterial Properties of Oligomeric Dehydrogenation Polymer from Lignin Precursors. *Molecules.* 2022 Feb 22;27(5):1466. <https://doi.org/10.3390/molecules27051466>. PMID: 35268566; PMCID: PMC8911982.
- Wianowska, D., Garbaczewska, S., Gieniecka-roslonkiewicz, A., Dawidowicz, A.L.(2016).** Comparaison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and Juglone. *Microb. Pathog.* 100 (2016), 263–267.
- Wieser H, Koehler P, Scherf KA.(2020).** The two faces of Wheat. *Front Nutr.* (2020) 7:517313. doi: 10.3389/fnut.2020.517313, PMID: [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- Willis, R.B., Allen, P.R. (1998).** An improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst* 123, 435–439.
- Wilson, R.M.; Danishefsky, S.J.(2007).** Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: The synthesis connection. *J. Org. Chem.* 2007, 71, 8329–8351. [Google Scholar] [CrossRef]
- Wilson D, Mubatanhema W, Jurjević Ž. (2002).** Biology and ecology of mycotoxigenic aspergillus species as related to economic and health concerns. *Advances in experimental medicine and biology.* Vol 504. p.3-17.
- Wink M., (2018).** Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction?. *Frontiers in Physiology* ,V 9(2018), <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00364>; DOI:10.3389/fphys.2018.00364



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Withlow, L.W, Hagler, W.M. (2001).** Mycotoxin contamination of feedstuffs as an additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. Craa Québec.

**Yogeswari, S., Ramalakshmi, S., Neelavathi, R., Muthumary, J. (2012).** Identification and comparative studies of different volatile fractions of *Monochaetia kanesensis* by GCMS. *Global J. Pharm.* 6(2):65-71

**Yücel, N. C., & Heybet, E. (2016).** Salicylic acid and calcium treatments improve wheat vigor, lipids and phenolics under high salinity. *Acta Chimica Slovenica*, 63(4), 738-746.

**Zakavi, F., Golpasand Hagh, L., Daraeighadikolaei, A., Farajzadeh Sheikh, A., Daraeighadikolaei, A., Leilavi Shooshtari, Z. (2013).** Antibacterial Effect of Juglans Regia Bark against Oral Pathogenic Bacteria, vol 5. Hindawi Pub Corporation Inter Jour of Dentistry.

**Zadocks, J. C., Chang, T. T. and Konzak, C. F. (1974).** A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.*, 6: 415-421.

**Zang, D., Hamauru, Y. (2003).** Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. 2003. *Food Agric. Environ.* 1(2), 22-27

**Zaiter A. (2017).** Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines. *Agronomie. Université de Lorraine*, 2017. Français. ffNNT : 2017LORR0012ff.

**Zari T, Al-Attar AM (2011)** Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15:413-426

**Zerrad.W, Hillaly.S, Mataoui El antris.B.S et El hmeyen.A, (2006).** Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur » *Journal of biochemistry and agroalimentary, Maroc*, p.1.pp67-123.

**Zhang, J., Ye, K.P., Zhang, X., Pan, D.D., Sun, Y.Y., Cao, J.X. (2017).** Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Black Pepper Essential Oil on Meat-Borne *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2017 Jan 4; 7:2094. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02094>. PMID: 28101081; PMCID: PMC5209337.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Zhao, Ming-Hui, Zi-Tao Jiang, Tao Liu, and Rong Li, (2014).**Flavonoids in Juglans regia L. leaves and evaluation of in vitro antioxidant activity via intracellular and chemical methods, The Scientific World Journal (2014) 51-59. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/303878>

**Żurek, N., Pycia, K., Pawłowska, A., Kapusta, I.T.(2022).** Phytochemical Screening and Bioactive Properties of Juglans regia L. Pollen. Antioxidants (Basel). 2022 Oct 18;11(10):2046. doi: 10.3390/antiox11102046. PMID: 36290769; PMCID: PMC9598064.

# **ANNEXES**

## Annexe 1. Matériels non biologique utilisés dans la partie phytochimique

### ➤ Réactif du screening phytochimique

**Réactif de Drangendorff** : ce réactif est composé de deux solutions :

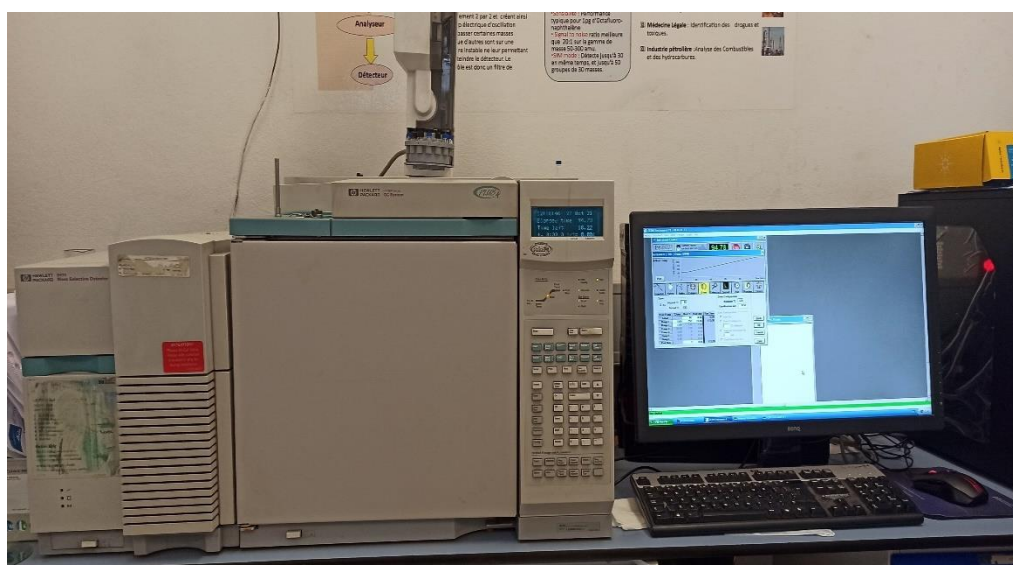
- Solution A : 2 g de subnitrate de bismuth, 25 ml d'acide acétique glacial et 100ml d'eau distillée.
- Solution B : 40 g d'iodure de potassium et 100ml d'eau distillée.

Le réactif est préparé en mélangeant 10 ml des solutions A et B à 20ml d'acide acétique glacial et 100ml d'eau distillée.

### ➤ Appareil et équipement utilisées dans la partie phytochimique



**Figure 1.** Un évaporateur rotatif (Original).

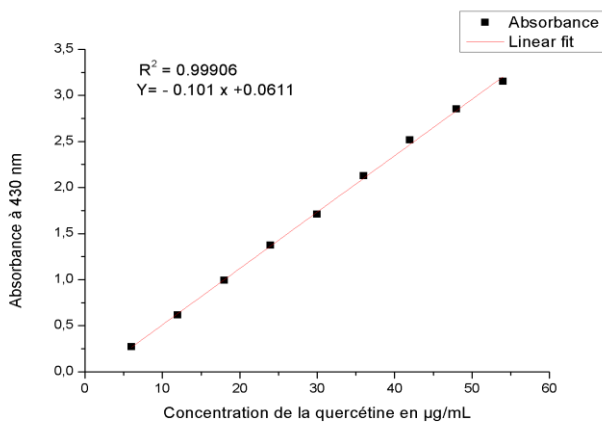


**Figure 2.** Appareil de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) (Original).

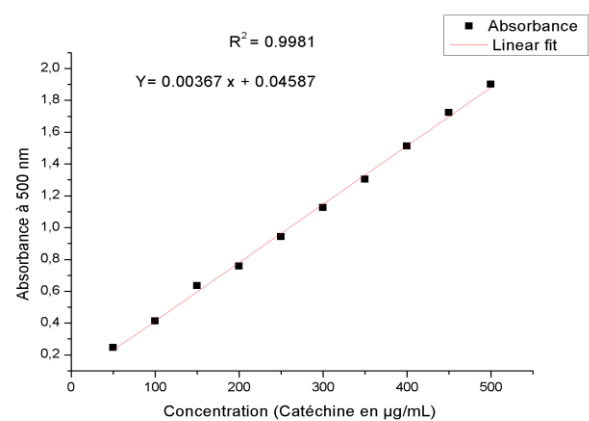


**Figure 3.** Appareil de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS/MS) (Original).

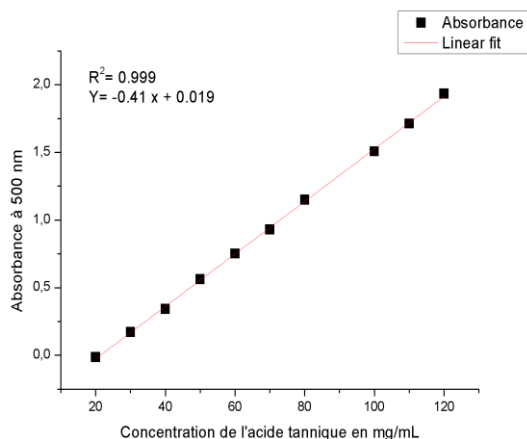
**Annexe 2. Courbes d'étalonnages des polyphénols, flavonoïdes, tanins galliques et tannins catéchiques.**



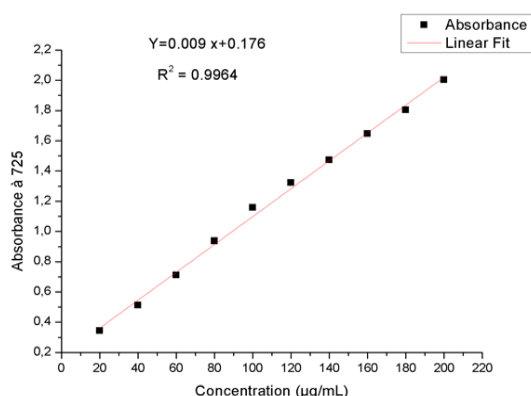
**Figure 4.** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux (Quercetine µg/ml)



**Figure 5.** Courbe d'étalonnage des tannins condensés (Catéchine µg/ml)



**Figure 6.** Courbe d'étalonnage des tanins hydrolysables

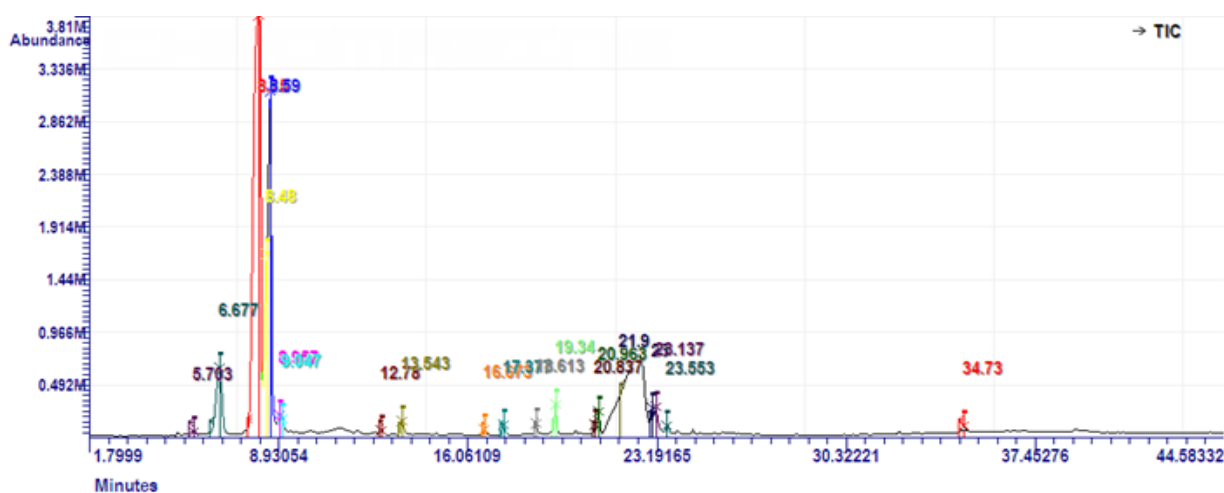


**Figure 7.** Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux (acide gallique)

**Tableau 1.** Teneur des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tanins hydrolysables et tanins condensés de l'ensemble des extraits des deux plantes Noyer et Olivier

Plante	Type d'extrait	TPC	TFC	HTC	CTC
<i>Juglans regia</i>	HMJ	263,22±0.45	58,45±3,71	63.23±0.33	42.2±0.58
	EPJ	73,33±0.34	36,11±0,23	-	-
	CHJ	54,23±1.23	25,98±4.30	-	-
	AEJ	114.26±2.32	51,55±1.23	-	-
	BTJ	133,39±1.95	43,27±1,02	-	-
	ACJ	89.33 ± 0.1	-	104.01 ± 0.2	66.8 ± 0.4
	TNJ	85.2 ± 0.33	-	95.26 ± 0.02	71.0 ± 0.21
<i>Olea europaea</i> var rougette	HMO	232,03±0.45	61,39±5,14	39.34±0.11	45.13±0.33
	EPO	62,22±0.02	34,23±0.22	-	-
	CHO	53,01±0,33	26,36±0,23	-	-
	AEO	163,0±3,39	53,12± 0,54	-	-
	BTO	118,04±6,04	49,91±0,67	-	-
	ACO	94.08±0.91	-	35.84±0.342	43.66±1.41
	TNO	73.95±2.38	-	33.37±0.543	50.90±0.35

### Annexe 3. Les chromatogrammes des extraits analysés par CG-MS



**Figure 8.** Chromatogramme de l'extrait éthérique d'*O.europaea* var rougette

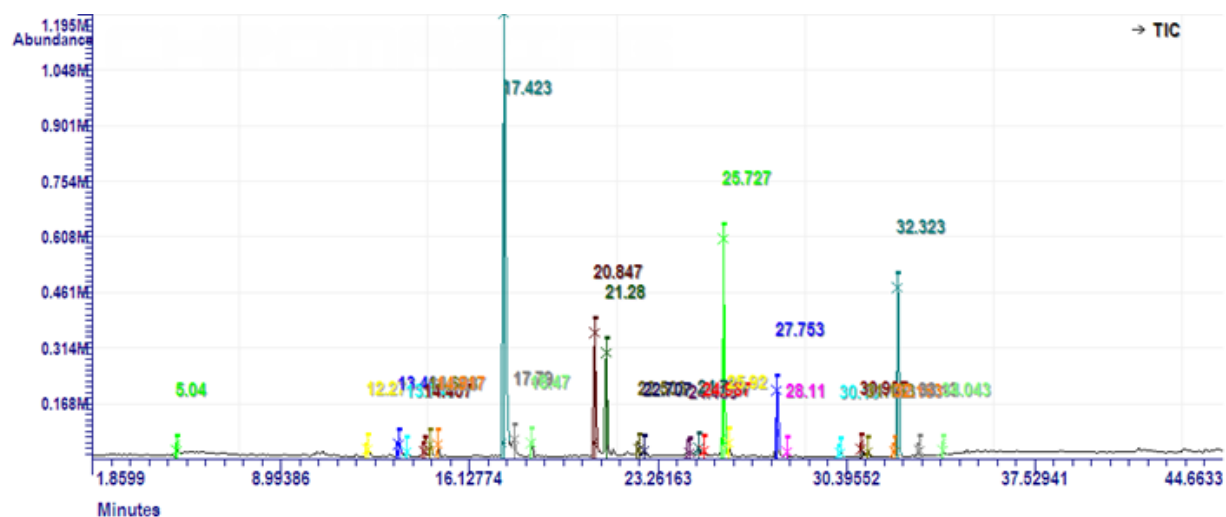


Figure 9. Chromatogramme de l'extrait éthérique de *J. regia* L

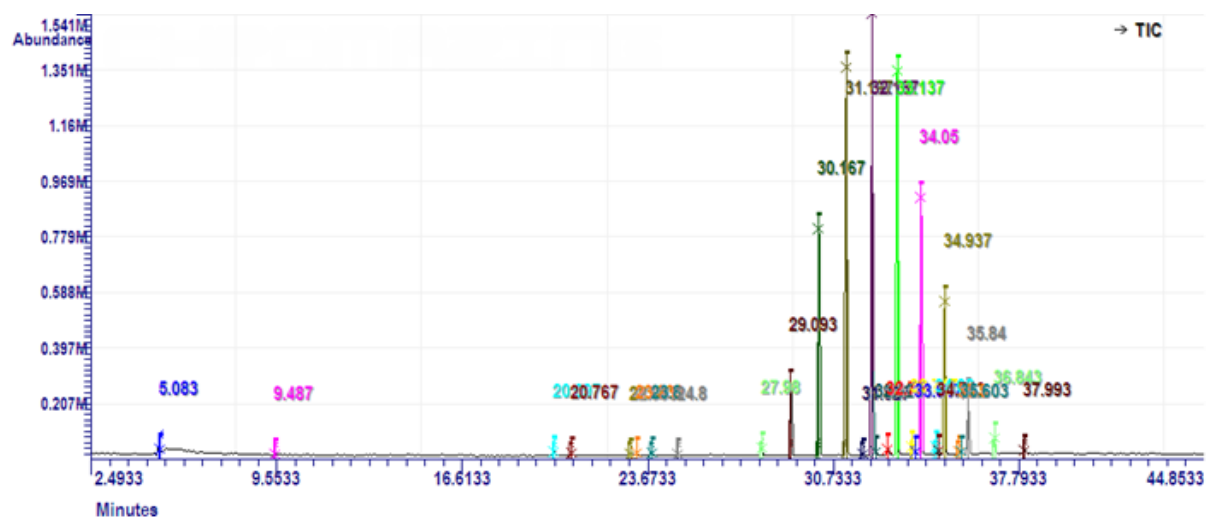


Figure 10. Chromatogramme de l'extrait chloroformique d'*O. europeae* var rougette

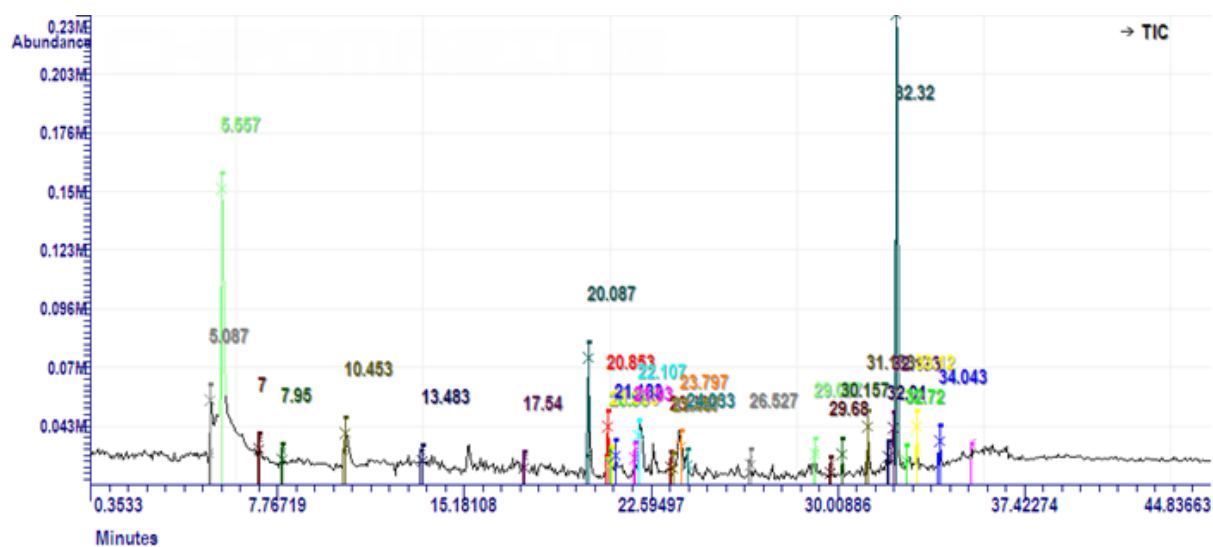


Figure 11. Chromatogramme de l'extrait chloroformique de *J. regia* L.

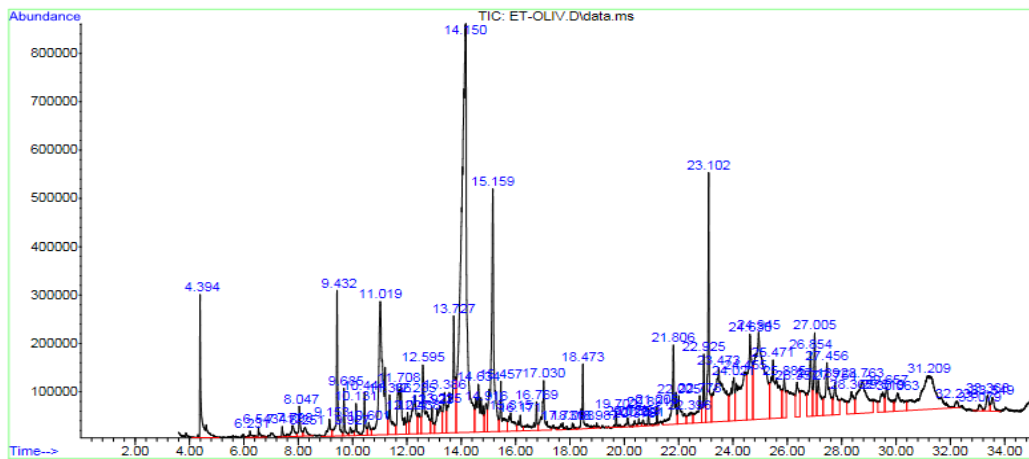


Figure 12. Chromatogramme de l'extrait tannique d'*O.europaea* var rougette

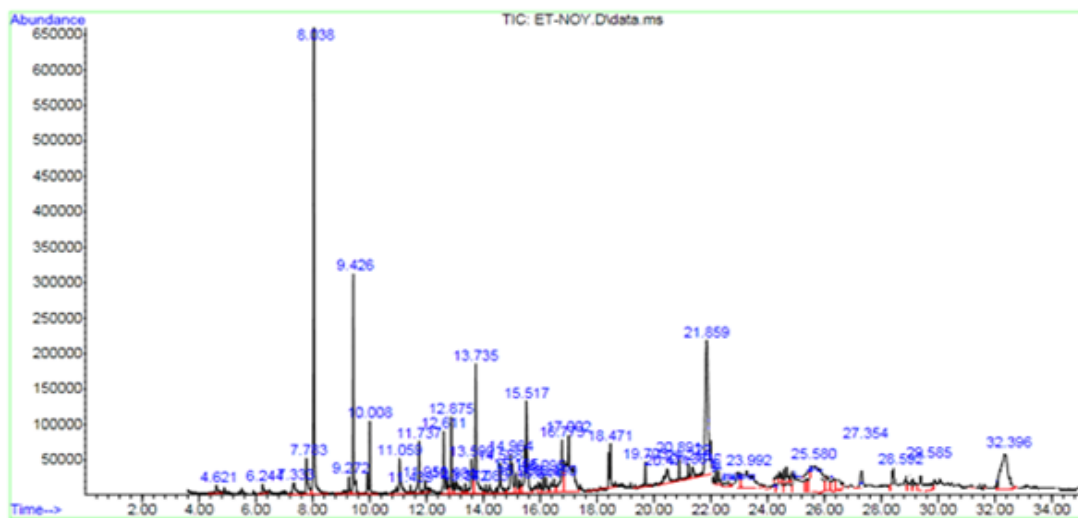


Figure 13. Chromatogramme de l'extrait tannique de *J.regia* L.

#### Annexe 4. Les chromatogrammes des fractions analysées par LCMS/MS

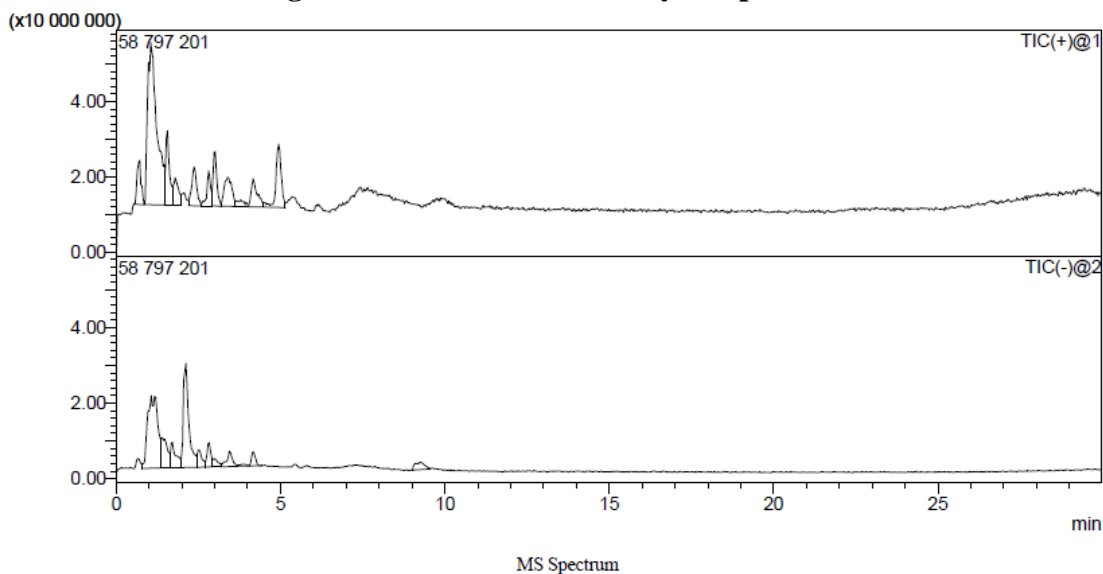
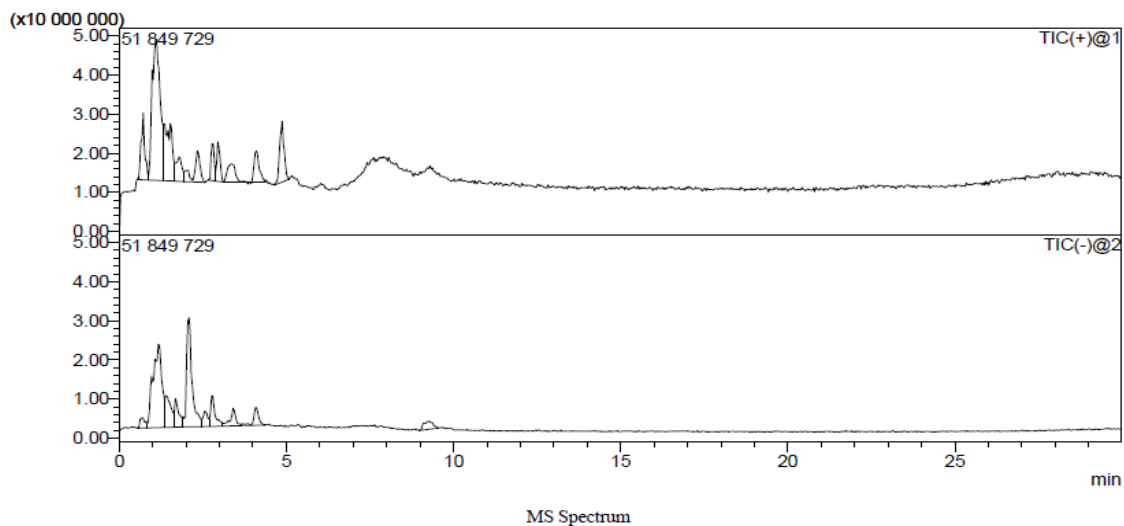
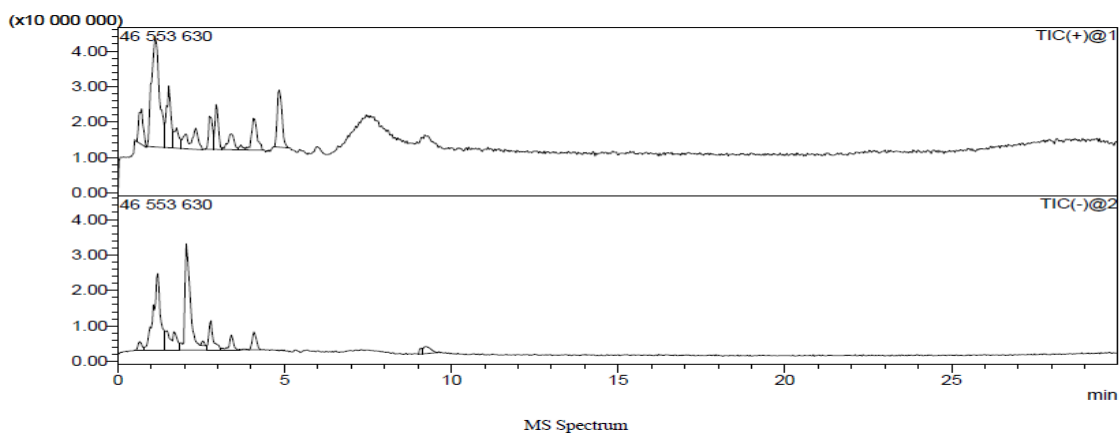


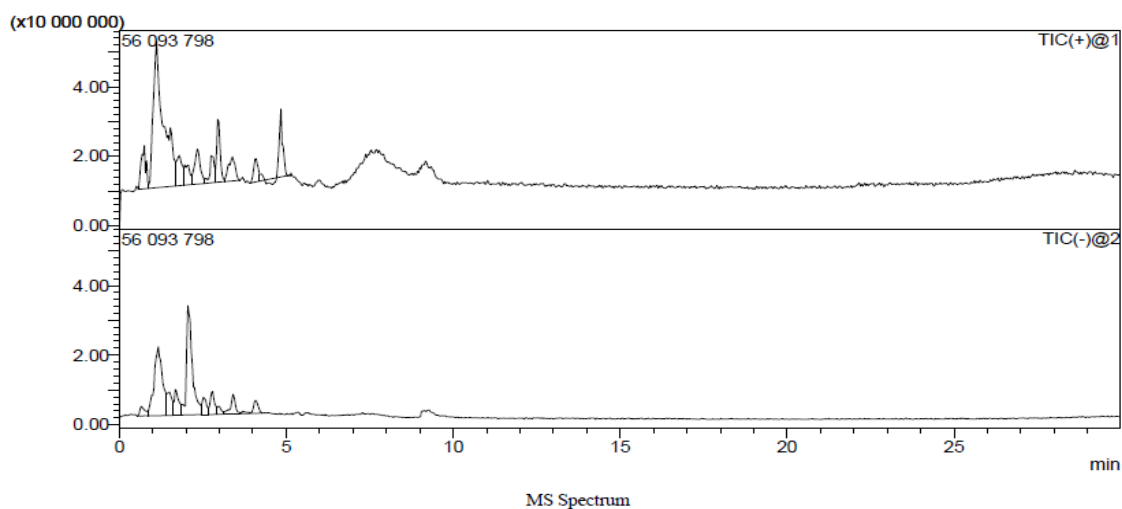
Figure 14. Chromatogramme de l'extrait acétate éthylique d'*O.europaea* var rougette



**Figure 15.** Chromatogramme de l'extrait acétate éthylique de *J.regia* L.



**Figure 16.** Chromatogramme de l'extrait butanolique d'*O.europeae* var rougette



**Figure 17.** Chromatogramme de l'extrait acétate éthylique de *J.regia*



## Annexe 5. Prélèvement du blé tendre stocké et données climatiques sur les régions de prélèvement.



Figure 18. Stockage du blé dans un hangar en vrac en métal fermés (Original)

Tableau 2. Le taux de grains de blé tendre concacés de différentes régions.

Echantillon / Région	Pourcentage	Ecart-standard (ES)
BT-Batna	6.33	0.11
ARZ-Batna	5.24	0.33
HD-Blida	7.66	0.33
BT-Blida	11.37	1.23
BT-M'sila	13.33	1.22
HD-Relizane	6.66	0.11
AA-Relizane	9.45	1.41
HD-Constantine	9.33	0.32

Tableau 3. Valeurs moyennes des données climatiques (température en °C, pluviométrie en mm et altitude en m) des régions durant les années d'échantillonnage 2019 et 2020.

	Altitude (m)	Température (°C)	Pluviométrie (mm)
Mascara	429	17,4	423
Relizane	375	18	458
Ain Defla	266	17,1	527
Blida	260	17,1	641
Tizi ousou	552	17	791
M'sila	471	18,6	249
Batna	1050	13,5	496
Constantine	694	15,6	469

## Annexe 6. Matériels non biologiques utilisés dans la partie mycologique

## ➤ Composition des différents milieux de cultures utilisés (Composants g/ litre)

## Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre 200 g

Dextrose 20 g

Agar 20 g

**Milieu PDB (Potato –Dextrose Broth)**

Infusion de pomme de terre 200g

Dextrose 15g

Agar 20g

**Milieu SWA-AW<sub>98</sub> (Soft Wheat Agar Activity of water 98) AW**

Blé tendre broyé 200g

Glycérol 20 mL

Agar 20 g

**Milieu PBS pH= 7.2±0.2**

Sodium dihydrogeno-phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.32 g

Disodium hydrogeno-phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1.09 g

NaCl 9g

H<sub>2</sub>O 1000 mL

**Milieu de conservation Glycérol 30%**

Glycérol 300 mL

Milieu PBS pH=7.2 ±0.2 700 mL

➤ Réactifs et équipements utilisés dans l'extraction d'ADN



Figure 19. Kit d'extraction d'ADN marque ZYMO RESEARCH (Original).



Figure 20. Thermocycleur (Original).



Figure 21. Electrophorèse sur gel d'agarose (Original).

## Annexe 7. Amorces utilisés dans l'identification moléculaire.

Tableau 4. Couples d'amorces utilisés dans l'identification des espèces fongiques

Isolat	Genre	Couples d'amorce	T° d'hybridation	Amorce sens	Amorce anti-sens
09BT12 (Asp 2)	<i>Aspergillus</i> sp.	ITS1,ITS4	60°C	5'CTTGGTCA TTTAGAGGA AGT AA-3'	5'TCCTCCGCT TATTGATA TGC-3'
S48-1 (Asp 1)	<i>Aspergillus</i> sp.	ITS1,ITS4	60°C	5'CTTGGTCA TTTAGAGGA AGT AA-3'	5'TCCTCCGCT TATTGATA TGC-3'
TAL48-10	<i>Penicillium</i> sp.	BT2a,BT2b	56°C	5'GGTAACCA AATCGGTGC TGCTTTC-3'	5'ACCCTCAG TGTAAGTAC CCTTGGC-3'
PEN48-12	<i>Penicillium</i> sp.	BT2a,BT2b	56°C	5'GGTAACCA AATCGGTGC TGCTTTC-3'	5'ACCCTCAG TGTAAGTAC CCTTGGC-3'

## Annexe 8a. Séquence de la région ITS2-ITS4 amplifiée par ITS2 et ITS4

*Aspergillus niger* isolate 09BT12 Numéro d'accèsion : ON796542

TGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCTTGTTCGGCCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCG  
TGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAA  
AACTTTCAACAATGGATCTC TTGGTTCCGGCATCGATGAA GAACGCAGCG  
AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTT  
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG  
TGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGC GGCACCGCGT  
CCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCG GCGCCTGCCG  
ACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC  
CCGCTGAACCTAAGCATATCATAGGCCGGAGGAAATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCC CACCTCCATC  
GTGTCTATTA TACCTGGTTG CTTCGCGGCCGCGCTGT

*Aspergillus sclerotiorum* isolate s48-1 Numéro d'accèsion : OP542354

CAACCTCCCACCCGTGTATACCGTACCTTGTTCGGCGGGCCCGCCGCGCAAGCGGCCGCGGGGGGGCGTCA  
AACCCCTCCCTAGGCGAGCGCCCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTTGTCTGAGTTTCA  
TTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCACCCCTGGTATCCGGGGG  
GTATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCGTCGTCGCCCCCGGGGACGGGC  
CGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTTGTAGGCCCGGGCCG  
CG CTGGCCGACGCTGAAAAGCAACCAACTATT TCTCCAGTT

## Annexe 8b. Séquences amplifiées par la région beta-tubuline Bt2a et Bt2b

*Talaromyces funiculosus* TAL48-10 Numéro d'accèsion : OR193001

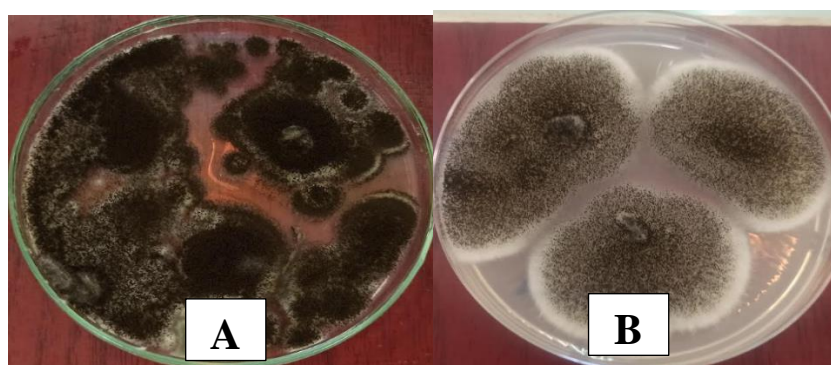
GTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTGAGTTAACTCAAACTATCAATTGGCGCAACAACACACTGACTCGTCCA  
GGCAAATCATCTCTGCTGAGCACGGTCTCGACGGTCCGGTGTGTAAGTATTCACGATCCGAAACCAACTACAATC  
AGACAGTATCTGATAATCAACAGCTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACG  
AGGTGCGTAAATCAAAGTCATCGTACAAACGGATATAAATCTCATAACGGTCCAGGCCTCTGGCAACAAATATGTC  
CCTCGTGCTGTCTGGTTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGATGCCGTCCGCGCTGGTCCCTTTGGTACGCTCTTCCG  
CCCCGATAACTTTGTATCTCTGCTGAGCACGGTCTCGACGGTCCGGTGTGTAAGTATTCACGATCCGAAACCAACT  
ACAATCAGACAGTATCTGATAATCAACAGCTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTT  
CAACGAGGTGCGTAAATCAAAGTCATCGTACAAACGGATATAAATCTCATAACGGTCCAGGCCTCTGGCAACAAAT

ATGTCCCTCGTGCTGTCCTGGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGATGCCGTCCGCGCTGGTCCCTTTGGTCAGCTC  
TTCCGCCCCGATAACTTTGTTTTTCGGTCAGTCCGGTGTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

***Penicillium chrysogenum* isolate PEN48-12 Numéro d'accèsion : OR193002**

AAAAAACGAAGTTAGGGGTTTCGACACGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTCTACCGTTACCGCGTTGCCTCGGCGGG  
CCCCTGGGGCCTGGCCCCGGTCGCCGGGGGGCTGCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCCCTGGAACCCCT  
GTCTGAATAGTGAGTCTGAGTGCATGATTGAATCATTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATG  
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  
GCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCCAGCGCGGTGGGTGTTGGGCGCTGT  
CCCCCGGGGACACGCCCAAAGGCAGTGGCGGCGCCGCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTCTGTACCCCGCT  
CGGGAGGGACTCGGTCGGCGCTGGTCTTCCCCCCCAGGCGGCCCTTCGGGGCTCGTCTCCTCCGGTTGACCTCGGAT  
CAGGTAGGGCTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAAACC

**Annexe 9. Souches fongiques de références utilisées dans l'étude antifongique**



**Figure 22.** Souches de références (A : *A.brasiliensis* ATCC16404 ; B : *A.carbonarius* M333)

**Tableau19. Chlorhydrate de terbinafine (10mg/ml)**

Souche	Asp1	Asp2	Asp3	<i>A.brasiliensis</i>	<i>A.carbonarius</i>	Pen1	Pen2	Pen3	Pen4	Pen5
I%	77.02±1.03	78.22±1.12	70±0	80±0	82.22±0.3	85.25±1.15	87.23±0.03	74.33±0.22	70±0	72.22±0.12

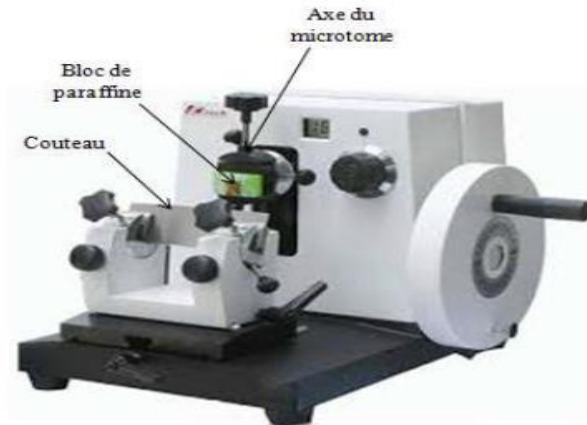
**Annexe 11. Effet des deux extraits les plus efficaces (TNJ, TNO) sur la germination des spores des souches testées.**

**Tableau 20.** Pourcentage d'inhibition de la germination des spores des souches du genre *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp.

Souche	Pourcentage d'inhibition de la germination (%)	
	TNO	TNJ
<b>Asp 1</b>	25.34±1.12	31.21±0.34
<b>Asp2</b>	27.4±1.89	23.31±1.99
<b>Asp3</b>	19.54±1.42	23.4±0.22
<b><i>A.carbonarius</i> M33</b>	32.28±1.39	42.12±2.3
<b><i>A.brasiliensis</i> ATCC16404</b>	42.25±1.41	33.25±3.15
<b>Pen1</b>	51.11±2.32	20.23±3.44
<b>Pen2</b>	37.32±1.99	14.32±1.33
<b>Pen3</b>	22.13±2.31	50.18±2.11
<b>Pen4</b>	17.45±1.22	7.68±3.1
<b>Pen5</b>	35.79±2.51	25.5±2.04

**Annexe 12. Matériels non biologiques de la partie insecticide**

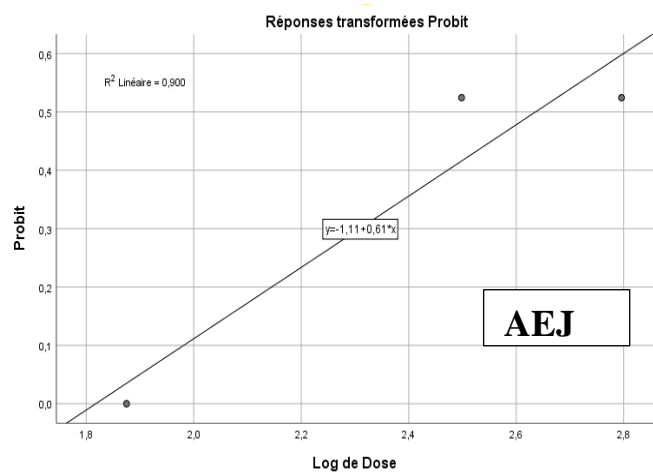
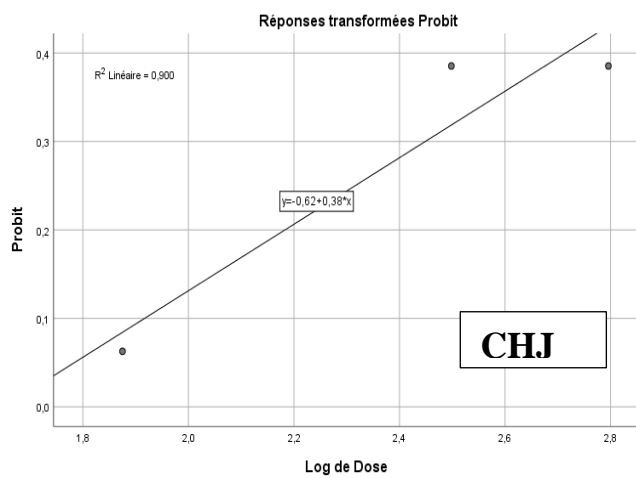
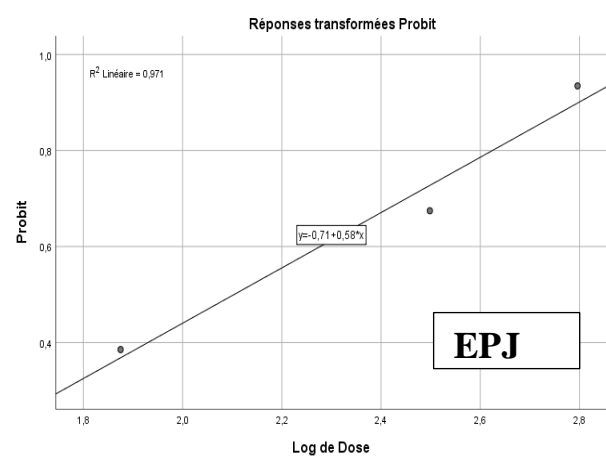
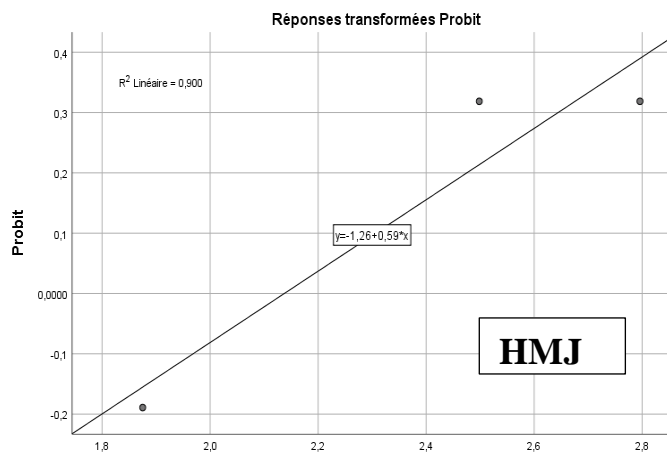
Des bocaux en verre, papier whatman n1, moustiquaire, micropipette réglable.

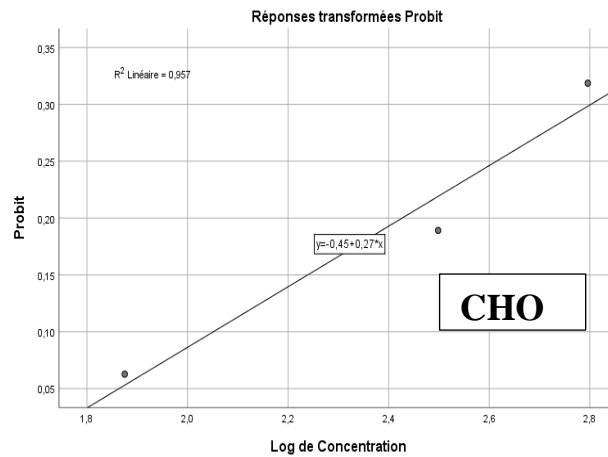
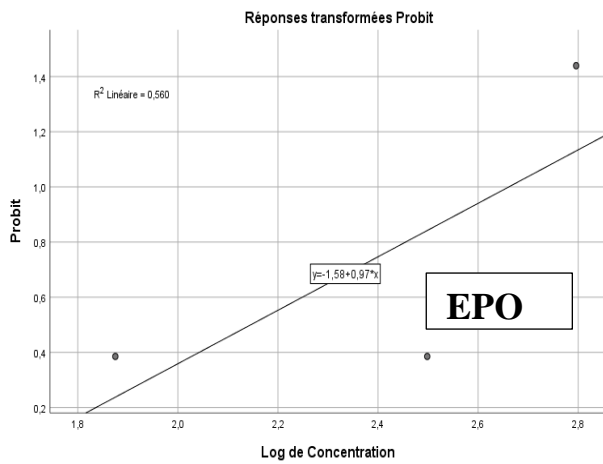
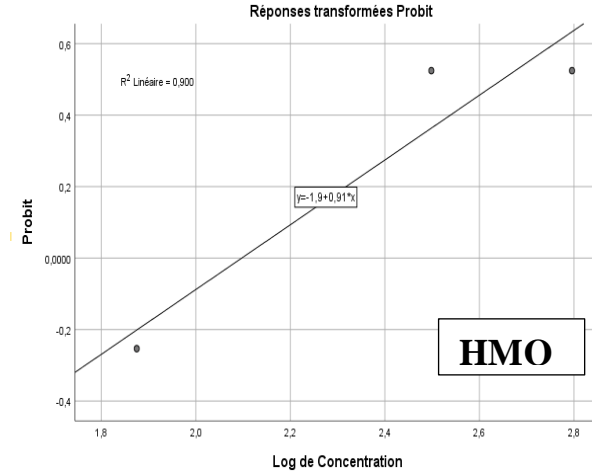
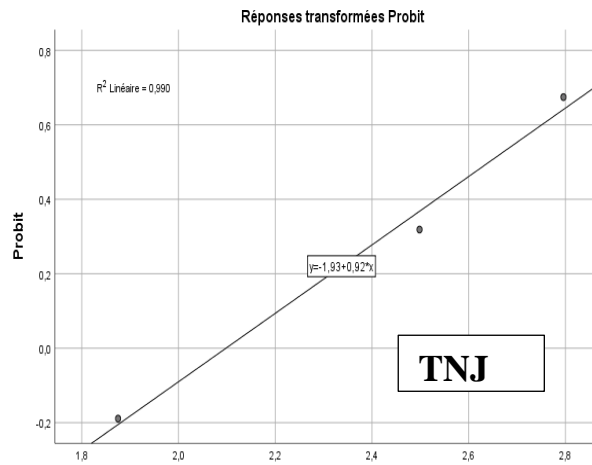
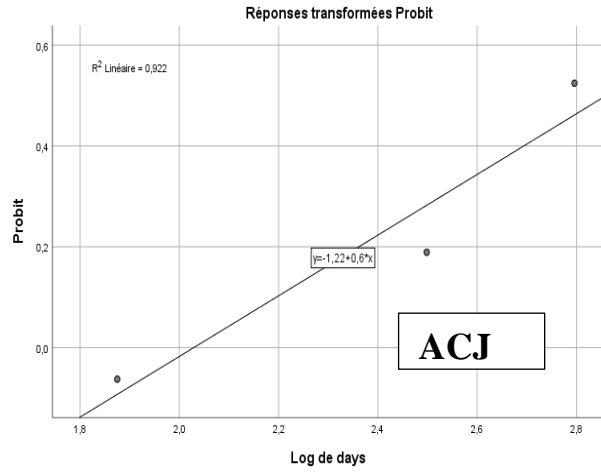
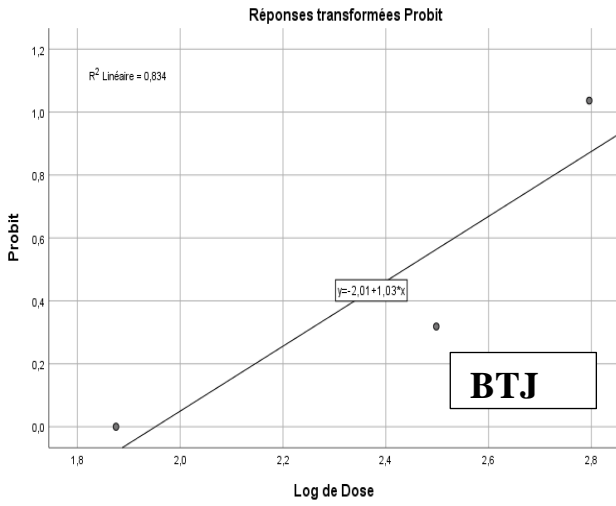


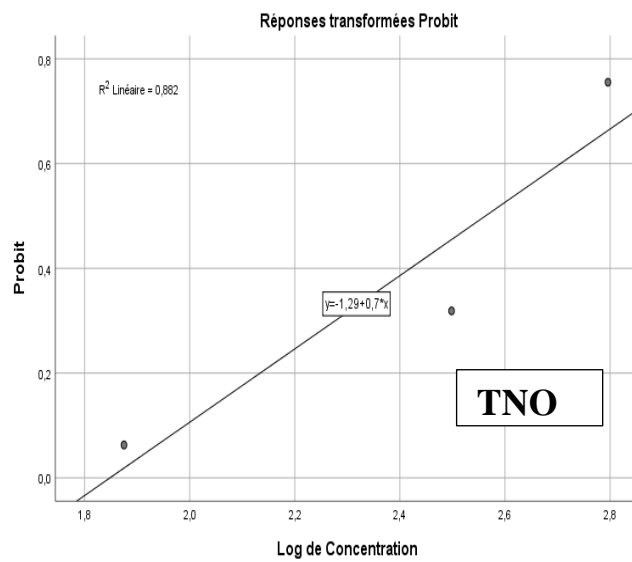
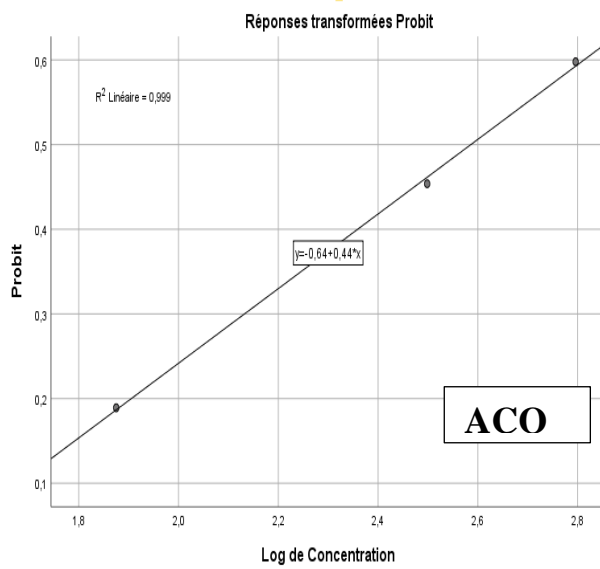
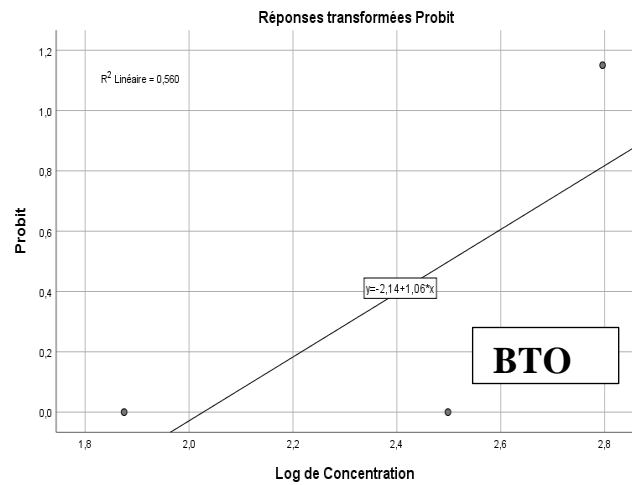
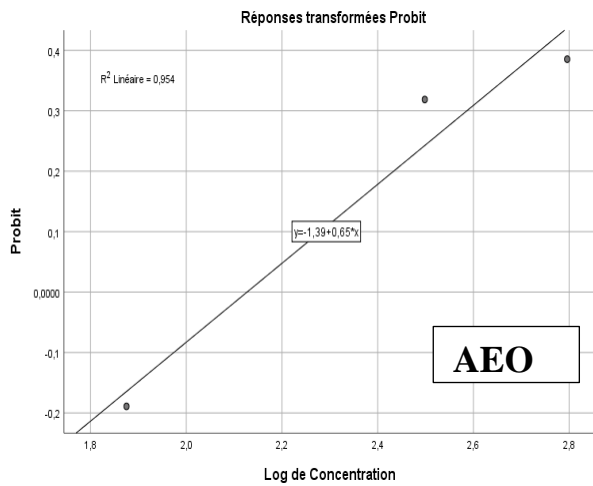
**Figure.** Fixation du porte objet avec le bloc de paraffine sur l'axe du microtome

**Annexe 14.** Les droites de régressions des probits en fonction du log doses des extraits.

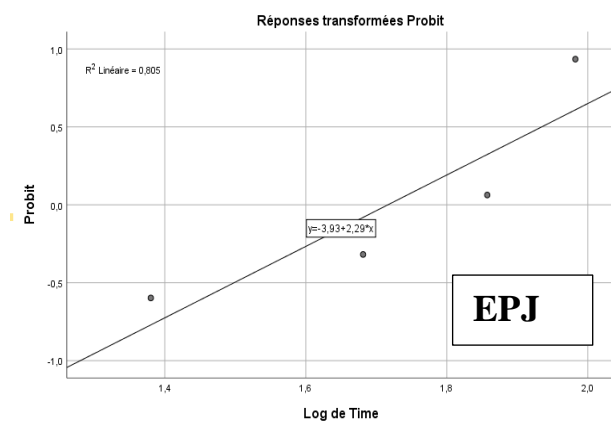
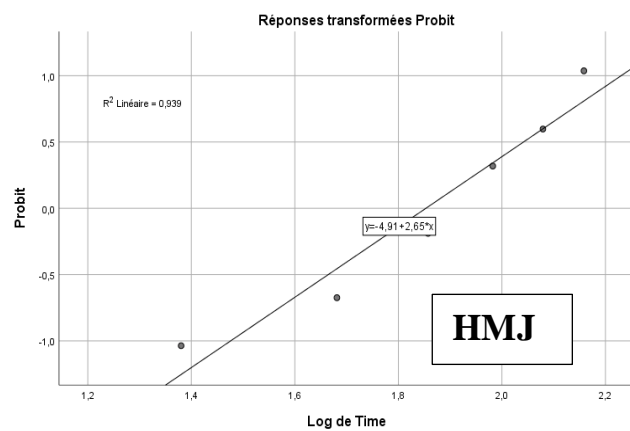
**+** **Droites de régressions des DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> des extraits de deux plantes Noyer et Olivier**



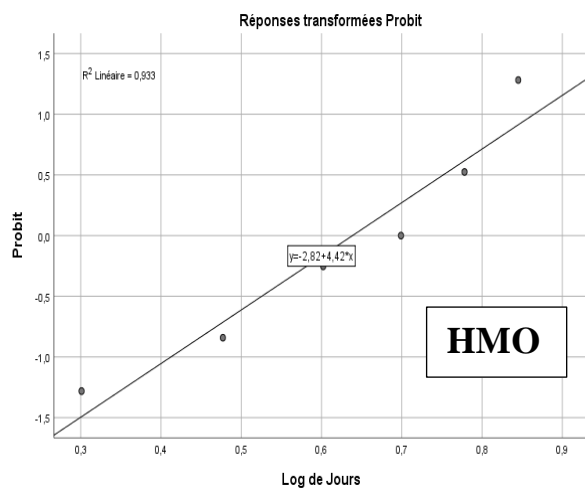
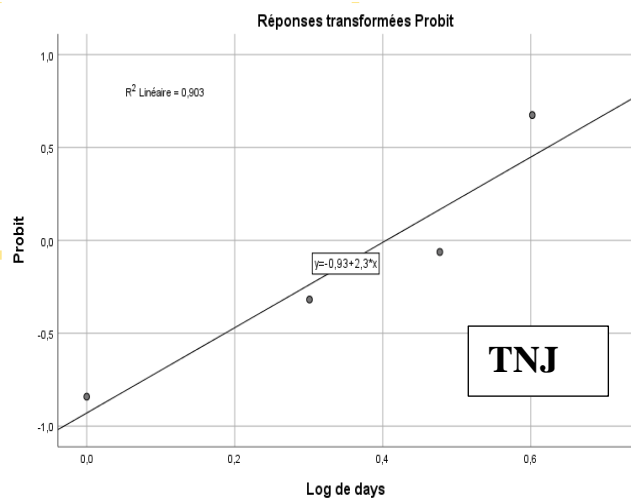
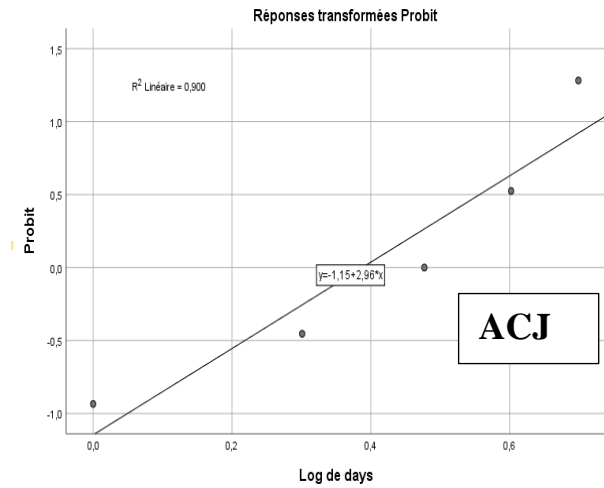
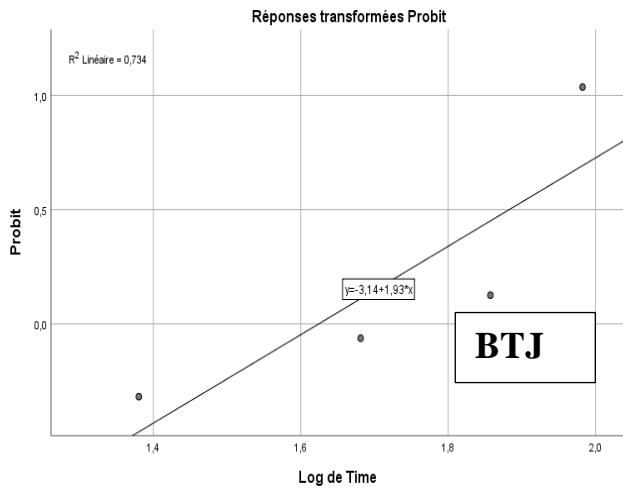
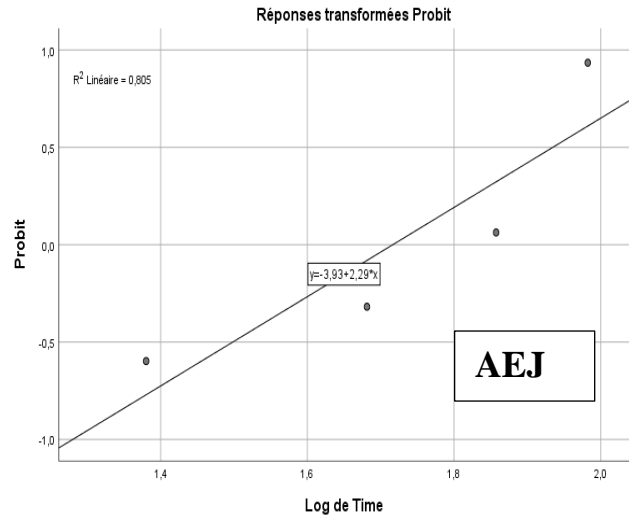
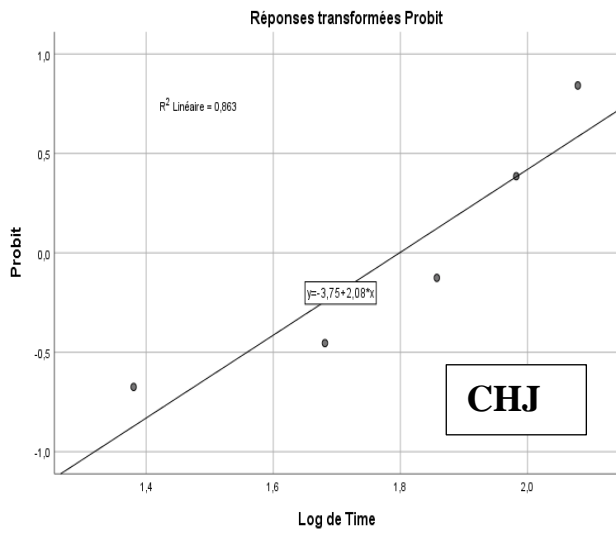


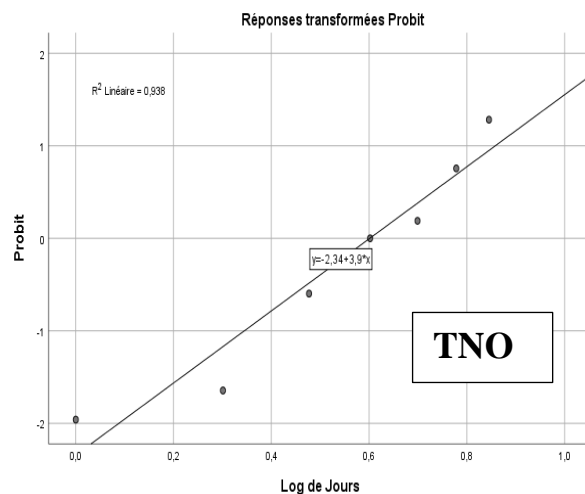
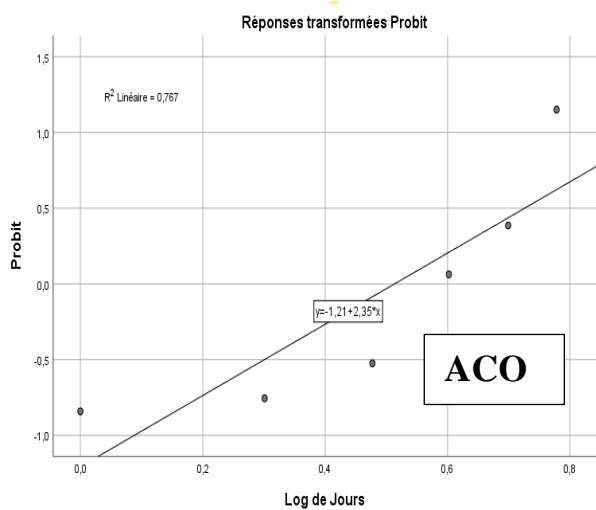
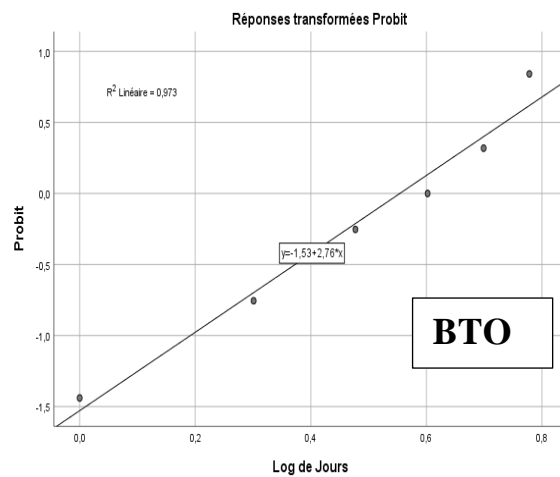
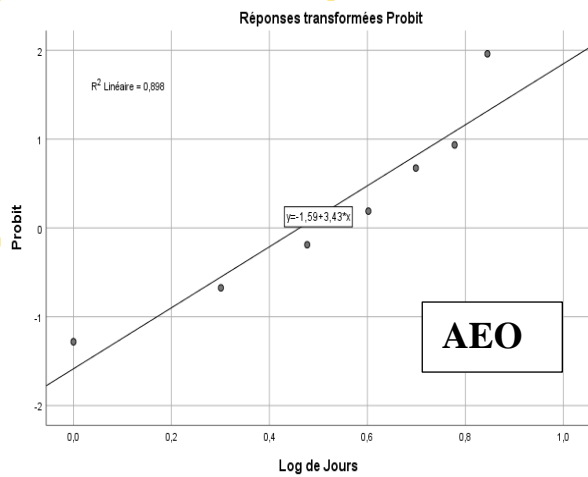
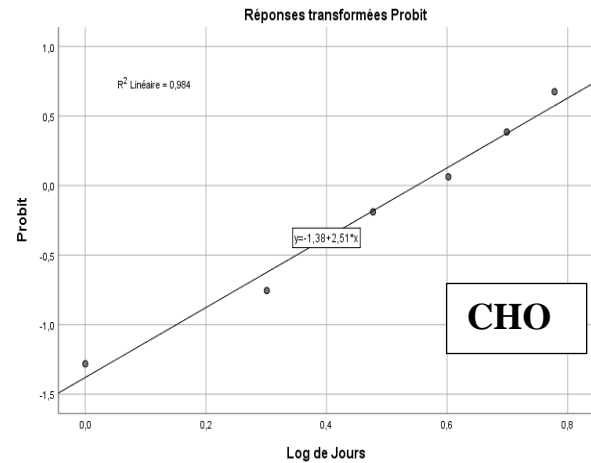
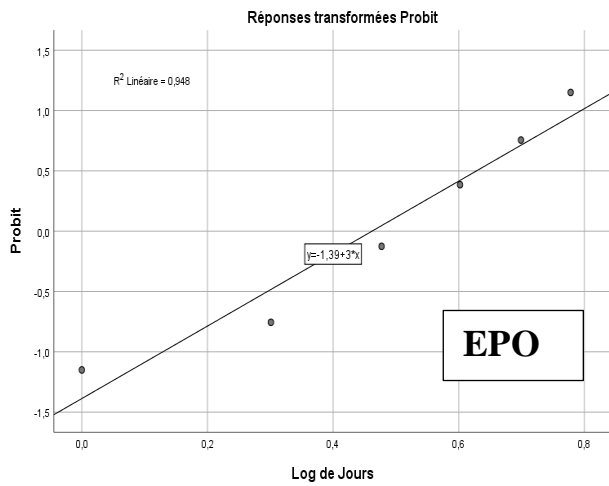


**Droites de régressions des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> des extraits de deux plantes Noyer et Olivier**









### Annexe 15. Tableau de l'étude statistique Anova-one way par le logiciel SPSS version 25.

- Comparaison journalière des taux de mortalité entre les 3 concentrations des extraits de *O.europaea* var rougette

Concentration 625µg/mL

Jours 1

	DDL	SC	SM	F	P
INTERCEP	1	22289.29	22289.29	985.4211	0.000000
EXTRAIT	6	1935.71	322.62	14.2632	0.000002
ERREUR	21	475.00	22.62		
TOTALE	27	2410.71			

**Jour 2**

	DDL	SC	SM	F	P
INTERCEP	1	41657.14	41657.14	1093.00	0.000000
EXTRAIT	6	1742.86	290.48	7.625	0.0000195
ERREUR	21	800.00	38.10		
TOTAL	27	2542.86			

**Jour 3**

	DDL	SC	SM	F	P
INTERCEP	1	78228.57	78228.57	1093.00	0.000000
EXTRAIT	6	621.43	103.57	7.625	0.073991
ERREUR	21	950.00	45.24		
TOTALE	27	1571.43			

**Jour 4**

	DDL	SC	SM	F	P
INTERCEP	1	160514.3	160514.3	3548.211	0.000000
EXTRAIT	6	2935.7	489.3	10.816	0.000016
ERREUR	21	950.00	45.2		
TOTALE	27	3885.7			

**Jour 5**

	DDL	SC	SM	F	P
INTERCEP	1	225003.6	225003.6	8217.522	0.000000
EXTRAIT	6	2921.4	486.9	17.783	0.000000
ERREUR	21	575.00	27.4		
TOTALE	27	3885.7			

**Jour 6**

	DDL	SC	SM	F	P
INTERCEP	1	225003.6	225003.6	8217.522	0.000000
EXTRAIT	6	2921.4	486.9	17.783	0.000000
ERREUR	21	575.00	27.4		
TOTALE	27	3885.7			

**Concentration 315 µg/mL****Jours 1 :**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	3657.143	3657.143	69.81818	0.000000
Extrait	6	842.857	140.476	2.68182	0.043086

Erreur	21	1100.00	52.381		
Totale	27	1942.857			

**Jour 2**

	DDL	SC	SC	F	P
Intercep	1	16514.29	16514.29	157.6364	0.000000
Extrait	6	685.71	114.29	1.0909	0.399841
Erreur	21	2200.00	104.76		
Totale	27	2885.71			

**Jour 3**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	52289.29	52289.29	636.5652	0.000000
Extrait	6	285.71	47.62	0.5797	0.0742342
Erreur	21	1725.00	82.14		
Totale	27	2010.71			

**Jour 4**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	102003.6	102003.6	3548.211	0.000000
Extrait	6	821.4	136.9	1.949	0.119536
Erreur	21	1475.00	70.2		
Totale	27	2296.4			

**Jour 5**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	154514.3	154514.3	2949.818	0.000000
Extrait	6	1585.7	264.3	5.045	0.002401
Erreur	21	1100.00	52.4		
Totale	27	2685.7			

**Jour 6**

	DDL	SS	MS	F	P
Intercep	1	235889.3	235889.3	15242.08	0.000000
Extrait	6	2285.7	381.0	24.62	0.000000
Erreur	21	325.00	15.5		
Totale	27	2610.7			

**Concentration 75 µg/mL****Jours 1 :**

	DDL	SS	MS	F	P
Intercep	1	2232.143	2232.143	56.81818	0.000000
Extrait	6	1042.857	173.810	4.42424	0.004823
Erreur	21	825.00	39.286		
Totale	27	1867.857			

**Jour 2**

	DDL	SS	S	F	P
Intercep	1	9289.286	9289.286	141.8727	0.000000

Extrait	6	1635.714	272.619	4.1636	0.0000195
Erreur	21	1375.00	65.476		
Totale	27	3010.714			

**Jour 3**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	36432.14	36432.14	927.3636	0.000000
Extrait	6	1642.86	273.81	6.9697	0.000350
Erreur	21	825.00	39.29		
Totale	27	2467.43			

**Jour 4**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	78228.57	78228.57	2738.000	0.000000
Extrait	6	1171.43	195.4	6.833	0.000397
Erreur	21	600.00	28.57		
Totale	27	1771.43			

**Jour 5**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	120914,3	120914,3	2539,200	0.000000
Extrait	6	1485,7	247.6	5.200	0,002032
Erreur	21	1000.00	47.6		
Totale	27	2485,7			

**Jour 6**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	182414,3	182414,3	2253,353	0.000000
Extrait	6	685,7	114,3	1,412	0,256590
Erreur	21	1700,0	81.0		
Totale	27	2385,7			

➤ Comparaison journalière des taux de mortalité entre les 3 concentrations des extraits de *J.regia* L.

**Concentration 625 µg/mL****Jours 1 :**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	15557,14	15557,14	56.81818	0.000000
Extrait	6	1342,86	223,81	6,7143	0,000444
Erreur	21	700,00	33.33		
Totale	27	2042,86			

**Jour 2**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	35003,57	35003,57	1278,391	0.000000
Extrait	6	1121,43	186,90	6.826	0.000400
Erreur	21	575.00	27.38		
Totale	27	1696,43			

**Jour 3**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	67032,14	67032,14	1706,273	0.000000
EXTRAIT	6	442,86	73,81	1.879	0,132109
ERREUR	21	825.00	39.29		
TOTALE	27	1267,86			

**Jour 4**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	148628,6	148628,6	2496,960	0.000000
Extrait	6	1721,4	286,9	4,820	0,003078
Erreur	21	1250,0	59.5		
Totale	27	2971,4			

**Jour 5**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	225003,6	225003,6	8217,522	0.000000
Extrait	6	2921,4	486,9	17,783	0,000000
Erreur	21	575,0	27,4		
Totale	27	3496,4			

**Jour 6**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	148225,0	148225,0	17787,00	0.000000
Extrait	6	675,0	225,0	27,00	0,000013
Erreur	21	100,0	8,3		
Totale	27	775,0			

**Concentration 315 µg/mL****Jours 1 :**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	3214,286	3214,286	75,00000	0.000000
Extrait	6	1085,714	180,952	4,22222	0,006105
Erreur	21	900,000	42,857		
Totale	27	1985,714			

**Jour 2**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	15557,14	15557,14	163,3500	0.000000
Extrait	6	1042,86	173,81	1,8250	0,142620
Erreur	21	2000,00	95,24		
Totale	27	3042,86			

**Jour 3**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	53157,14	53157,14	769,8621	0.000000
Extrait	6	192,86	32,14	0,4655	0,825929
Erreur	21	1450,00	69,05		
Totale	27	1642,86			

**Jour 4**

	DDL	SC	SM	F	P

Intercep	1	102003,6	102003,6	1748,633	0.000000
Extrait	6	1071,4	178,6	3.061	0,025946
Erreur	21	1225,0	58,3		
Totale		2296,4			

**Jour 5**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	151557,1	151557,1	2767,565	0.000000
Extrait	6	1492,9	248,8	4,543	0,004205
Erreur	21	1150,0	54,8		
Totale	27	2642,9			

**Jour 6**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	232232,1	232232,1	10267,11	0.000000
Extrait	6	2792,9	465,5	20,58	0,000000
Erreur	21	475,0	22,6		
Totale	27	3267,9			

**Concentration 75 µg/mL****Jours 1 :**

	DDL	SC	MS	F	P
Intercep	1	1575.000	1575.00	33,92308	0,000009
Extrait	6	550,000	91,667	1,97436	0,115335
Erreur	21	975,000	46,429		
Totale	27	1525,000			

**Jour 2**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	8575,000	8575,000	163,3500	0.000000
Extrait	6	1500,000	250,000	3,6842	0,011703
Erreur	21	1425,0000	67,857		
Totale	27	2925,000			

**Jour 3**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	36432,14	36432,14	927,3636	0.000000
Extrait	6	1642,86	273,81	6,9697	0,000350
Erreur	21	825,00	39,29		
Totale	27	2467,86			

**Jour 4**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	73032,14	73032,14	1752,771	0.000000
Extrait	6	1592,86	265,48	6,371	0,000616
Erreur	21	875,00	41,67		
Totale	27	2467,86			

**Jour 5**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	117003,6	117003,6	1786,964	0.000000

Extrait	6	1721,4	286,9	4.382	0,005066
Erreur	21	1375,0	65,5		
Totale	27	3096,4			

**Jour 6**

	DDL	SC	SM	F	P
Intercep	1	180803,6	180803,6	2489,754	0.000000
Extrait	6	571,4	95,2	1,311	0,295362
Erreur	21	1525,0	72,6		
Totale	27	2096,4			

➤ **Comparaison entre les DL50, DL90, TL50 et TL90 des différents extraits des deux plantes.**

	DDL	LC50	LC50	LC50	LC50
		SC	SM	F	p
Extrait	13	69664,8	5358,8	13,5644	0,000000
Erreur	28	11061,8	395,1		
Totale	41	80726,6			

	DDL	LC90	LC90	LC90	LC90
		SC	SM	F	p
Extrait	13	1,493087E+11	1,148528E+10	3,277344	0,004116
Erreur	28	9,812456E+10	3,504449E+09		
Totale	41	2,474333E+11			

	DDL	LT50	LT50	LT50	LT50
		SC	SM	F	p
Extrait	13	13,6568	1,0505	8,164	0,000002
Erreur	28	3,6028	0,1287		
Totale	41	17,2596			

	DDL	LT90	LT90	LT90	LT90
		SC	MS	F	p
Extrait	13	51,528	3,964	52,76	0,000000
Erreur	28	2,104	0,075		
Totale	41	53,632			

**Remarque :****DDL : Degré de liberté****SC : sommes des carrées****SM : sommes des moyennes****F : fischer**



**P : probabilité**

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### 1. Publications internationales entrant dans le cadre de la thèse

**Amel Bennacer**, Fatma Sahir-Halouane, Sabrina Aitslimane-Aitkaki, Zahia Oukali, Ivo Vaz Oliveira, Naima Rahmouni, Mohammed Aissaoui. Structural characterization of phytochemical content, antibacterial, and antifungal activities of *Juglans regia* L. leaves cultivated in Algeria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, Volume 40, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102304>

**Amel Bennacer**, Fatma Sahir-Halouane, Sabrina Aitslimane-Aitkaki, Farida Tihar-Benzina, Zahia Oukali, Ivo Vaz Oliveira, Naima Rahmouni, Mohammed Aissaoui, Ramar Muhankumar. Exploring antifungal properties of Tannin extracts from *Olea europaea* var *rougette* leaves against *Aspergillus* spp. *Vegetos*, Springer, 2024, <https://doi.org/10.1007/s42535-024-00830-6>

### 2. Communications internationales

Evaluation of the antifungal activity of the ethanolic extract of *Juglans regia* L. Leaves grown in Algeria, Centre Universitaire Salhi Ahmed Naama, **07-08 Avril 2021**.

*Olea europaea* var *rougette* leaves as a good source of polyphenols with antimicrobial properties, Université Abbass Laghrour Khenchla, **15-16 Mars 2023**.

### 3. Communications nationales

Phytochemical study of the *Olea europaea* var *rougette* leaves cultivated in Blida region, University M'hamed Cherif Messadia Souk Ahras, **24-25 Novembre 2021**.

Evaluation of the antifungal activity of the olive leaves extract against filamentous fungi, Université Blida **1, 9,10,11 Juin 2021**.