

République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine 1

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة قسنطينة 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° DE SERIE

MEMOIRE

EN VUE DE L' OBTENTION DU DIPLOME DEMASTER

Option : Métabolisme secondaire et molécules bioactive

THEME

Etude quantitative et qualitative des composés phénolique chez trois variétés de blé dur (*Tritium durum.Desf*) soumises à un stress hydrique et leurs activités antimicrobiennes

Présenté par :

- Ghorab Maroua
- Djaaleb Sabira

Devant le jury :

- **Président** : Mr.Chibani Salih MCB Université Constantine 1
- **Promoteur** : Mlle. Chaib Ghania MCB Université Constantine 1
- **Examineurs** : Mme. Bouchoukh Imen. MAA Université Constantine 1

Année universitaire 2013-2014

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et remerciements à Mlle. CHAIB Ghania.

➤ *Qui a initié et dirigé notre travail.*

➤ *Et avec laquelle nous avons beaucoup appris.*

Aussi nous adressons nos vifs remerciements :

- *A la président du jury: Mr. CHIBANI Salih Professeur à l'Université Mentouri.*
- *Madame BOUCHOUKH Imen, Maitre assistante à l'Université Mentouri, qui a accepté d'être membre du jury et d'examiner ce mémoire.*
- *Moncieur BAKA Mbarek professeur à l'Université Mentouri.*

Introduction	1
Partie 01 : synthèse bibliographique	
I. Blé dur (<i>Triticum durum</i>)	
I. 1. Description générale de la plante	2
I. 2. Historique, origine et classification	2
I.3.Taxonomie	
I.4.Le cycle de développement	4
I.4.1 La période végétative	4
I.4.2 la période reproductive	5
I.5.La production Algérienne	6
I.6. La culture du blé dur	6
II. Les composés phénoliques	
II.1. Généralités	7
II.2.Biosynthèse des composés phénoliques	8
II.2.1.La voie de shikimate	9
II.2.2.Voie de l'acétate malonate	10
II.3.Principales classes des composés phénoliques	11
II.3.1. Les acides phénoliques simples	11
II.3.1.1. Acides hydroxybenzoïques	12
II.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques	12
II.3.1.3. Coumarines	12
II.3.2 Les flavonoïdes	
II.3.2.1Généralités	13
II.3.2.2 Structure	13
II.3.2.3. Biosynthèse	14
II.4. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols	15
II.4.1. Effet variétal	15
II.4.2. Effet de la transformation technologique	15
II.4.3. Conditions de culture	
II.4.3.1 Lumière du soleil	16
II.4.3.2 Température	16
II.4.3.3 Stress hydrique	17

II.4.4. Effet de stockage	17
II.5. Compartimentage ou localisation dans la plante	18
III. Effet du stress hydrique sur le développement des plantes	
III.1. L'eau dans la plante	18
III.2. Notion de stress	19
III. 3. Le stress hydrique	19
III.4. Effet du déficit hydrique sur le blé	20
III.5.Mécanismes d'adaptation à la sécheresse	20

IV. Phytothérapie

IV.1 Définition	21
IV.2. Différents types de la Phytothérapie	21
IV.3. Les avantages de la phytothérapie	21
V. Activité antibactérienne et antifongique	22
V.1. Activité antibactérienne	22
V.2. Activité antifongique	23

Partie 02 : Matériel et méthode

I. Matériel végétal	24
II.2.Préparation de la matière végétale	24

II. Etude des polyphénols

II.1.Dosage des polyphénols (Aspect quantitatif)	26
II.1. 1.Protocole d'extraction	26
II.1. 2. Protocole de dosage	27
III.1.3.Calcul des teneurs	28

II.2.Extraction, identification et séparation des composés phénoliques (Aspect qualitatif)

II.2.1. Extraction	29
II.2.2.Affrontement entre solvants (partition entre solvants)	29
II.2.2.1.Ether de pétrole	29
II.2.2.2.Ether diéthylique	30
II.2.2.3.Acétate d'éthyle	30
II.2.2.4.Butanone	30
II.3.Identification	31
II.3.1.Spectrophotométrie UV-Visible	

II.3. 1.1. Principe	31
II.3. 1.2. Analyse spectrale des phases	32
II.3. 2..Chromatographie sur couche mince	32
II.3. 2.1. Définition et appareillage.	32
II.3. 2. 2. Principe de la technique.	33
II.3. 2.3. Protocole suivi pour la réalisation du CCM	33
II.3. 2.4. Révélation	36
II.3. 2.5. Calcul du rapport frontal	37
III. Activités antibactérienne et anti fongique	37
III.1. Préparation des disques	38
III.2. Préparation du milieu nutritif	38
III.3. Stérilisation du matériel	38
III.4. Préparation des boîtes	38
III.5. Ensemencement et dépôt des disques (Activités antibactériennes)	38
III.6. Activités antifongiques	38
III.7. Mesures des zones d'inhibition	40
Partie 03 : Résultats et discussion	
I. Dosage des polyphénols (Aspect quantitatif)	41
II. Extraction et identification des polyphénols (Aspect qualitative)	
II.1 Extraction	42
II.2 Identification	44
II.2.1. Analyse spectrale	44
II.2.2 Analyse chromatographique	47
III. Activité antimicrobienne	58
III.1 Activité antibactérienne	58
III.1.1 Phase D'éthyle Acétate	60
III.1.2. Phase Ether diéthylique	65
III.1.3. Phase Butanone	69
III.1.4. Phase aqueuse	73
III. 2 Activité antifongique	76

LISTE DES TABLAUEUX

Tableau I : principales classes des composés phénoliques	10
Tableau II: Principaux acides hydroxybenzoïques	12
Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques	12
Tableau VI : Principaux types de coumarines	13
Tableau V: Les principales caractéristiques des variétés choisies	24
Tableau IV: quantité de la matière végétal macérée	29
Tableau V: Les phases obtenues après affrontements entre trois solvants successifs (Traitement SDH)	42
Tableau VI: Les phases obtenues des affrontements entre trois solvants successifs (Traitement ADH)	43
Tableau VII: Description des phases aqueuses (Traitement SDH et ADH)	43
Tableau VIII : les rapports frontaux des taches apparues dans la CCM (traitement SDH)	53
Tableau IX : les rapports frontaux des taches apparues dans la CCM (traitement ADH)	54
Tableau X : les intervalles du R_f pour les quatre phases	55
Tableau XI : Relation entre le R_f et la structure	55
Tableau XII : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes	56
Tableau XIII : Les flavonoïdes contenus dans les phases de chaque traitement (SDH et ADH)	57

LISTE DES FIGURE

Figure 1 : Origine génétique du blé dur (<i>Triticum durum</i> Desf.)	3
Figure 2: Les stades repères de la vie du blé	5
Figure 3: La voie de shikimate	8
Figure 4 : voie de l'acétate malonate	9
Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes	13
Figure 6: Biosynthèse des flavonoïdes	14
Figure 7: Dispositif expérimental du semis	25
Figure 8 : Protocole de préparation de l'extrait phyto-étanolique	27
Figure 9 : Mesure de l'absorption	28
Figure 10 : Déroulement d'un affrontement	30
Figure 11 : L'extraction des polyphénols	31
Figure 12: L'appareillage de l'analyse spectrale	32
Figure 13: Mode de dépôt pour une CCM)	35
Figure 14 : développement du chromatogramme	35
Figure 15: Lampe à UV (254 nm)	36
Figure 16 : Le rapport frontal	37
Figure 17: Etapes du test de l'activité antimicrobiennes	39
Figure 18: Mesure des diamètre de zone d'inhibition	40
Figure 19 : Teneur en polyphénols chez les trois variétés de blé dur aux deux traitements SDH et ADH	41
Figure 20 : le spectre du méthanol pur	44
Figure 21 : Spectre d'adsorption des phases des trois variétés de blé dur au traitement SDH	45

LISTE DES TABLAEUX

Tableau I : principales classes des composés phénoliques	10
Tableau II: Principaux acides hydroxybenzoïques	12
Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques	12
Tableau VI : Principaux types de coumarines	13
Tableau V: Les principales caractéristiques des variétés choisies	24
Tableau IV: quantité de la matière végétale macérée	29
Tableau V: Les phases obtenues après affrontements entre trois solvants successifs (Traitement SDH)	42
Tableau VI: Les phases obtenues des affrontements entre trois solvants successifs (Traitement ADH)	43
Tableau VII: Description des phases aqueuses (Traitement SDH et ADH)	43
Tableau VIII : les rapports frontaux des taches apparues dans la CCM (traitement SDH)	53
Tableau IX : les rapports frontaux des taches apparues dans la CCM (traitement ADH)	54
Tableau X : les intervalles du R_f pour les quatre phases	55
Tableau XI : Relation entre le R_f et la structure	55
Tableau XII : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes	56
Tableau XIII : Les flavonoïdes contenus dans les phases de chaque traitement (SDH et ADH)	57

LISTE DES FIGURE

Figure 1 : Origine génétique du blé dur (<i>Triticum durum</i> Desf.)	3
Figure 2: Les stades repères de la vie du blé	5
Figure 3: La voie de shikimate	8
Figure 4 : voie de l'acétate malonate	9
Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes	13
Figure 6: Biosynthèse des flavonoïdes	14
Figure 7: Dispositif expérimental du semis	25
Figure 8 : Protocole de préparation de l'extrait phyto-étanolique	27
Figure 9 : Mesure de l'absorption	28
Figure 10 : Déroulement d'un affrontement	30
Figure 11 : L'extraction des polyphénols	31
Figure 12: L'appareillage de l'analyse spectrale	32
Figure 13: Mode de dépôt pour une CCM)	35
Figure 14 : développement du chromatogramme	35
Figure 15: Lampe à UV (254 nm)	36
Figure 16 : Le rapport frontal	37
Figure 17: Etapes du test de l'activité antimicrobiennes	39
Figure 18: Mesure des diamètre de zone d'inhibition	40
Figure 19 : Teneur en polyphénols chez les trois variétés de blé dur aux deux traitements SDH et ADH	41

Figure 20 : le spectre du méthanol pur

44

Figure 21 : Spectre d'adsorption des phases des trois variétés de blé dur au traitement SDH 45

Figure 22 : Spectre d'adsorption des phases des trois variétés de blé dur au traitement ADH 46

Figure 23: CCM de la phase aqueuse traitement SDH des variétés Haurani, Hedba et GGR, dans le système H₂O distillée / butanol / ETOH 48

Figure 24 : CCM de la phase aqueuse traitement ADH des variétés Haurani, Hedba et GGR, dans le système H₂O distillée / butanol / ETOH 49

Figure 25: CCM de la phase Méthyle Ethyle Cétone, des variétés Haurani, Hedba et GGR, stade SDH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol 50

Figure 26: CCM de la phase Méthyle Ethyle Cétone, des variétés Haurani, Hedba et GGR, traitement ADH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol 50

Figure 27: CCM de la phase Acétate D'éthyle, des variétés Haurani, Hedba et GGR, stade dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol 51

Figure 28: CCM de la phase Acétate D'éthyle des variétés Haurani, Hedba et GGR stade ADH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol 51

Figure 29: CCM de la phase Ether Diéthylique. Des variétés Haurani, Hedba et GGR, stade SDH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol 52

Figure 30: CCM de la phase Ether Diéthylique. Des variétés Haurani, Hedba et GGR, stade ADH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol 52

Figure 31 : Présence de la zone d'inhibition 58

Figure 32 : Les résultats de l'effet de l'extrait des trois variétés du blé dur sur *E.coli* et *Bacillus* aux deux traitements SDH et ADH dans la phase d'éthyle Acétat 59

Figure 33 : Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase D'éthyle Acétate; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 60

Figure 34 : Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase D'éthyle Acétate; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 63

- Figure 35 :** Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Phase Ether diéthylique; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 65
- Figure 36:** Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Ether diéthylique; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 67
- Figure 37 :** Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Butanone; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 69
- Figure 38 :** Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Butanone; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 71
- Figure 39 :** Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase aqueuse; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 73
- Figure 40 :** Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase aqueuse; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus* 75
- Figure 41 :** Résultats de l'activité antifongique 76

INTRODUCTION

L'environnement en Algérie est très marqué par la sécheresse, le froid et les fortes chaleurs et qui sont souvent présents.

Ces contraintes de production, sont aussi combinées les unes aux autres, aggravant ainsi le rendement du blé dur.

Les ressources en eau sont très limitées et les apports pluviométriques sont irréguliers.

Ces dernières années, la sécheresse est devenue un phénomène fréquent qui pénalise les régions du nord et particulièrement celle de l'ouest algérien.

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire.

Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols, les huiles essentielles etc.

Parmi ces composés, les polyphénols représentent l'un des groupes les plus importants du fait de leur faible toxicité et beaucoup d'avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires.

Ces dernières années, nous avons assisté à un important regain des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes. Ces derniers ont montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes.

Nous pouvons dire que ce sont notamment de grands antioxydants et antimicrobiens.

I. La plante sélectionnée : blé dur

I. 1. Description générale de la plante

Le blé dur (*Triticum durum Desf.*) est une plante annuelle de la classe de Monocotylédones de la famille des Graminées, de la tribu des Triticées et du genre *Triticum* (Feillet, 2000). En termes de production commerciale et d'alimentation humaine, cette espèce est la deuxième plus importante du genre *Triticum* après le blé tendre.

Le système racinaire comprend des racines séminales produites par la plantule durant la levée, ainsi que des racines adventives assurant la nutrition et le développement de la plante.

L'appareil aérien est une tige formée des nœuds séparés par d'entre-nœuds. Le feuillage du blé dur est peu plus clair que celui du blé tendre. Il est plutôt totalement glabre. Le tallage est faible. Les chaumes sont longs et souples (Soltner, 2005). Cet appareil assure de son part le processus de la photosynthèse et de la transpiration.

L'appareil reproducteur est issu de l'inflorescence d'épi. L'épi est un axe central ou proprement dit un rachis solide, qui porte de 3 à 4 fleurs et de 15 à 25 épillets. Cette disposition est un caractère très important, pour le mode de reproduction de toute la famille poacées. C'est l'autofécondation ou l'autogamie (Prats et Grandcourt, 1971 ; Soltner, 2005). Par définition, l'autofécondation signifie que la fleur est hermaphrodite ; elle contient les deux organes mâles et femelle, et la fécondation se fait souvent avant l'ouverture de la fleur. Par conséquent, le patrimoine génétique est préservé, ce qui permet à grand échelle la conservation de la pureté variétale de l'espèce (Simmond, 1974).

Le fruit est une graine sèche unique appelée le caryopse. Le caryopse est caractérisé par une soudure entre la graine et le péricarpe (la paroi de l'ovaire).

I. 2. Historique, origine et classification

Le blé est l'une des premières espèces cultivées par l'homme. Depuis plus de 7000 à 10000 ans, le blé occupe le croissant fertile, zone couvrant la Palestine, la Syrie, l'Irak et une grande partie de l'Iran (Croston et Williams, 1981). Des vestiges de blés, diploïdes et tétraploïdes, remontant au VII^{ème} millénaire avant J.C ont été découverts sur des sites archéologiques au

Proche Orient (Harlan, 1975).

Le blé dur espèce connue depuis la plus haute antiquité, appartient au groupe des tétraploïdes, du genre *Triticum* qui comprend de nombreuses espèces. Le blé (*Triticum*), le riz (*Oriza L.*) et le maïs (*Zea mays L.*) constituent la base alimentaire des populations du globe et semblent avoir une origine commune : issues d'une même espèce ancestrale qui aurait contenu tous les gènes dispersés chez les trois espèces actuelles (Yves et De Buyser, 2000).

Selon Mackey, (1968), l'origine génétique du blé dur remonte au croisement entre deux espèces ancestrales *Triticum monococcum* et une graminée sauvage du nom d'*Aegilops speltaoides*. Le blé dur (*Triticum durum*) appelé ainsi en raison de la dureté de son grain, possède $2n= 4x = 28$ chromosomes. D'après Feillet, (2000), le croisement naturel de *Triticum monococcum* (porteur du génome A) \times *Aegilops speltaoides* (porteur du génome B) a permis l'apparition d'un blé dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidum ssp.dicoccoïdes*) qui a ensuite progressivement évolué vers *Triticum turgidum ssp.dicoccum* puis vers *Triticum durum* (blé dur cultivé) (Fig. 1)

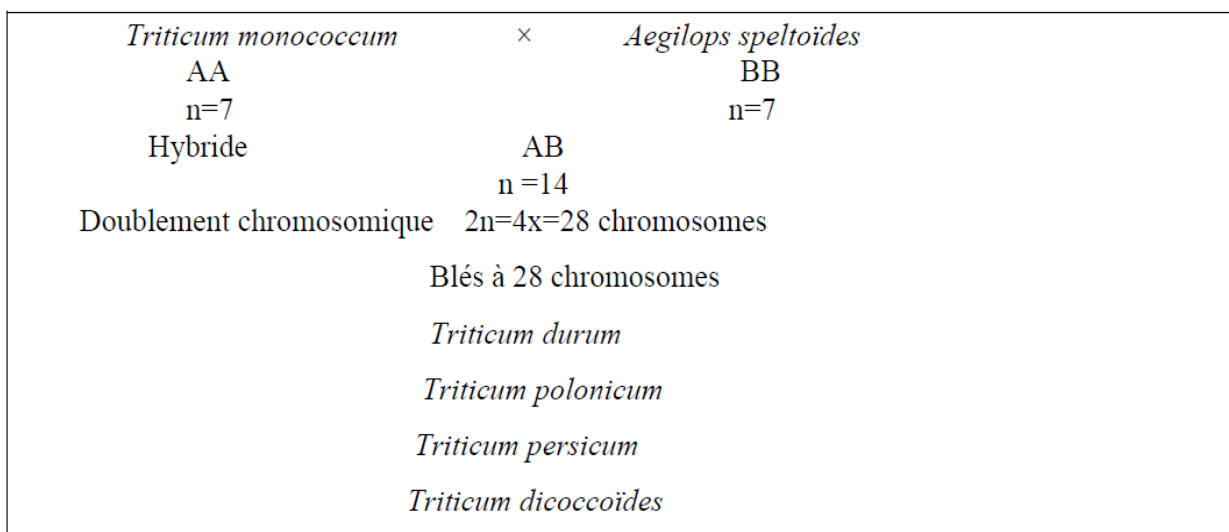


Figure 1 : Origine génétique du blé dur (*Triticum durum* Desf.)

(Croston et Williams, 1981).

I.3.Taxonomie

Le blé appartient à l'ordre des poales et la famille des poacées ou anciennement appelée graminées. C'est une vaste famille qui comprend environ 600 genres et 5000 espèces. La classification du blé dur est la suivante:

Embranchement	Spermaphytes
S /Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Poales
Famille	Poacées
<i>Genre</i>	<i>Triticum</i>
<i>Espèce</i>	<i>Triticum durum Desf.</i>

I.4. Le cycle de développement

Qu'elles soient vivaces ou annuelles, toutes les graminées ont un rythme de végétation et de fructification annuel. Dans ce cycle, une série d'étapes séparées par des stades repères, permettant de diviser en deux périodes la vie des céréales (Prats et Grandcourt, 1971; Soltner, 2005 ; Hadria 2006) :

I.4.1. La période végétative

Cette période comprend les phases suivantes:

- ✓ La germination: correspond à l'entrée de la semence en vie active et au tout début de croissance de l'embryon.

- ✓ la levée: cette période est caractérisée par le nombre de feuilles de la jeune plantule et leur stade de développement (Giban *et al.*, 2003).

- ✓ le tallage : le début du tallage est marqué par l'apparition de l'extrémité de la 1ère feuille de la talle latérale .Puis, d'autres talles naissent successivement, formant un plateau du tallage situé juste au niveau. Le fin tallage est celle de la fin de la période végétative, elle marque le début

de la phase reproductive (Gates, 1995; Hadria, 2006).

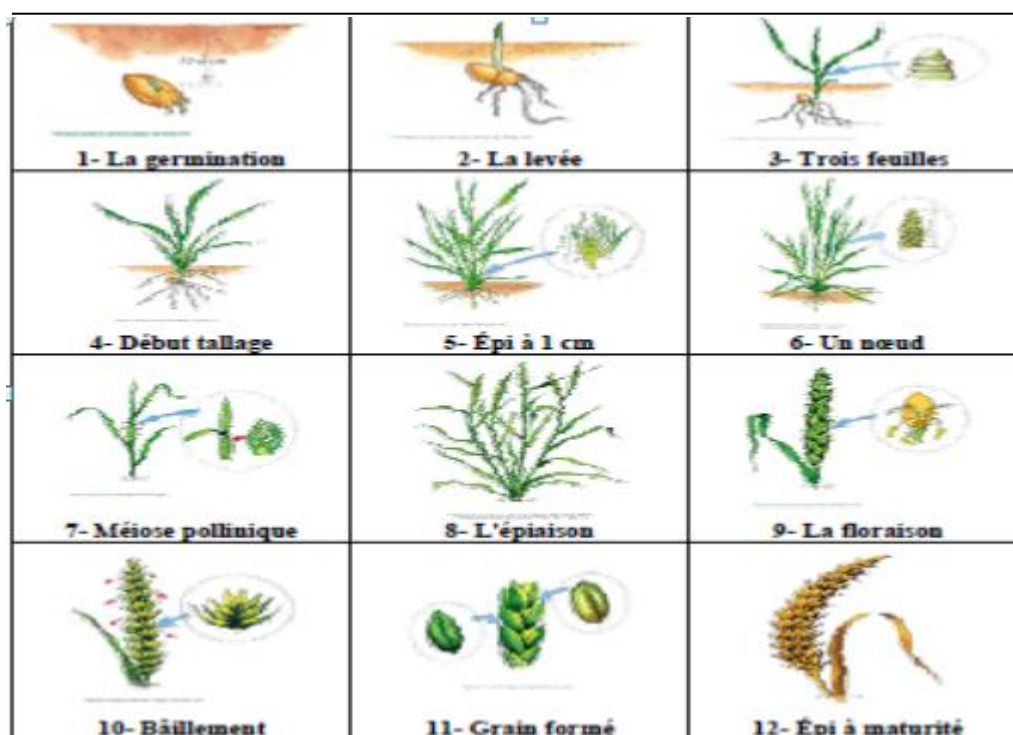


Figure 2: Les stades repères de la vie du blé (Giban et al 2003)

I.4.2. La période reproductive

Cette période comprend les phases suivantes:

✓ La montaison: ce stade est repérable une fois l'ébauche de l'épi du brin maître, atteint 1cm de hauteur. Cette phase s'achève une fois l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la feuille étendard qui gonfle (stade gonflement) (Gates, 1995; Giban *et al.*, 2003).

✓ L'épiaison: est la période allant de l'apparition des premiers épis jusqu'à la sortie complète de tous les épis hors de la gaine de la dernière feuille (Giban *et al.*, 2003)

✓ La floraison: est la sortie des premières étamines hors des épillets au milieu de l'épi sur 50% des épis.

La formation du grain se fait quand les grains du tiers moyen de l'épi parviennent à la moitié de leur développement. Ils se développent en deux stades:

- Le stade laiteux où le grain vert clair, d'un contenu laiteux atteint cette dimension définitive. Le grain contient encore 50% d'humidité et le stockage des protéines touche à sa fin

- Le stade pâteux où le grain, d'un vert jaune, s'écrase facilement. Le grain a perdu son humidité et l'amidon a été constitué.

✓ La maturité complète: la teneur en humidité atteint environ 20%. Le grain est mûr et prêt à être récolté, c'est alors la période des moissons. (Giban *et al.*, 2003).

I.5. La production Algérienne

Sous une surface totale de 937 millions d'hectares en Algérie, seulement 3.3% est utilisé pour l'agriculture dont 38% de ces terres sont occupées par les céréales (Benbelkacem, 2007).

La production des céréales constitue pour l'Algérie un enjeu capital du fait même de son importance tant sur le plan de l'alimentation que celui de l'agriculture, mais cette production ne couvre pas les besoins nationaux.

La production moyenne annuelle de 18 millions de quintaux ne couvre que 50% de la demande nationale, ce qui engendre le recours à l'importation (Benbelkacem, 2007).

I.6. La culture du blé dur

Le blé dur est bien adapté aux régions à climat relativement sec, où il fait chaud le jour et frais la nuit durant la période végétative, ce qui est typique des climats méditerranéens et tempérés (Amokrane, 2001).

La plus grande partie du blé dur produit dans le monde est constituée de blé de printemps. Toutefois, il existe des variétés de blé dur d'hiver qui ont besoin de vernalisation pour amorcer la transition de la phase végétative à la phase reproductrice. Ces variétés ont été évaluées en vue de la production dans le Sud des États-Unis (Donmez *et al.*, 2000 et Schilling *et al.*, 2003).

II. Les composés phénoliques

II.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix *et al.*, 2005). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Macheix *et al.*, 2005)

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Macheix *et al.*, 2005)

II.2.Biosynthèse des composés phénoliques

II.2.1.La voie de shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques. Elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Kening *et al.*, 1995) (Figure 2)

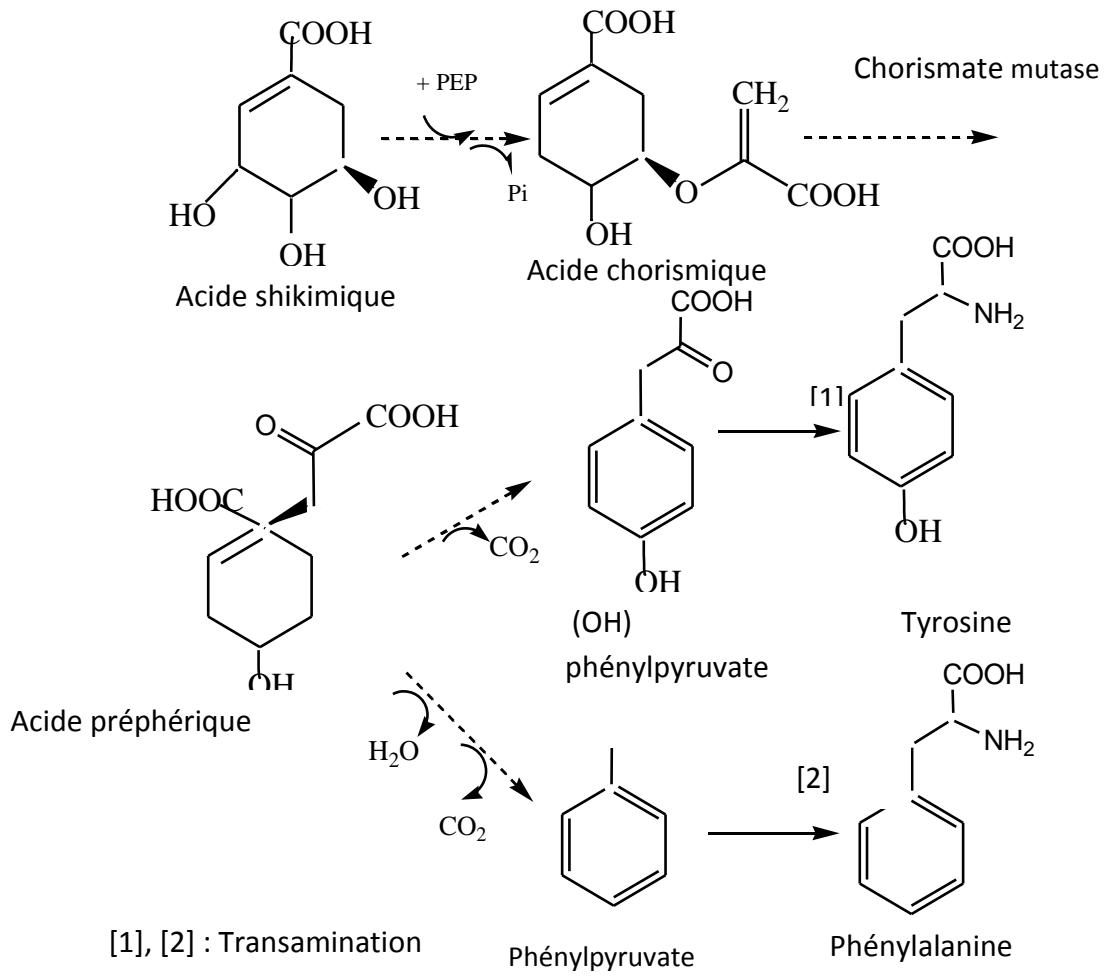
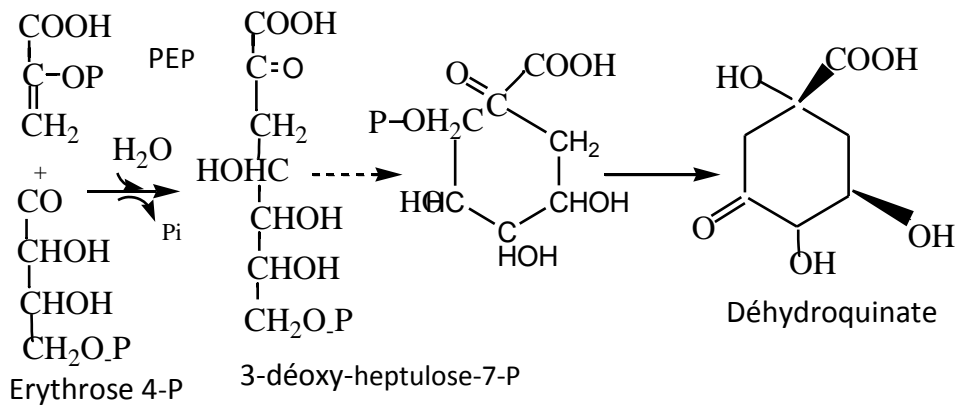
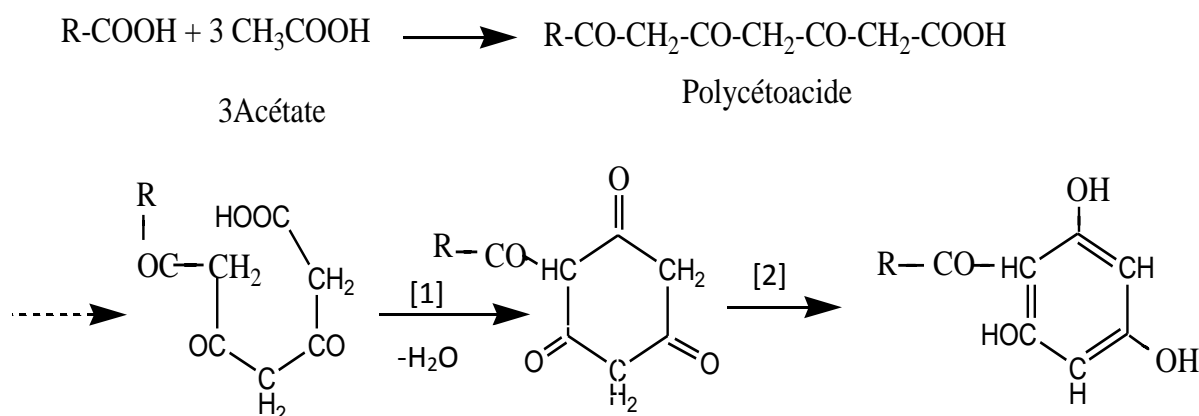


Figure 3: La voie de shikimate (marghem, 2009).

II.2.2. Voie de l'acétate malonate

Ce mode de formation plus secondaire consiste en cyclisation des chaînes polycétoné. Elles sont mêmes obtenues par condensation de groupement acétates qui ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl coA en malonyl-coA



[1] : C-acylation (1-6) [2] : énolation R=CH₃ : trihydroxyacétophénone


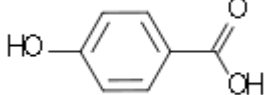
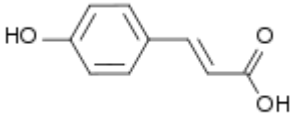
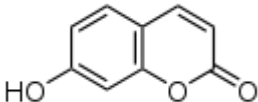
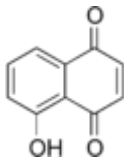
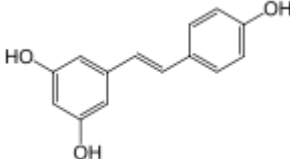
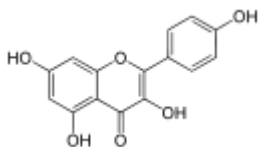
Figure 4 : voie de l'acétate malonate (Merghem, 2009).

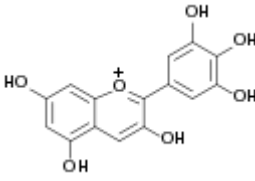
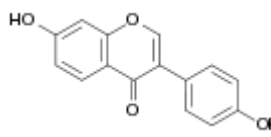
II.3. Principales classes des composés phénoliques

En se basant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes des composés phénoliques (Tableau I) :

Tableau I : principales classes des composés phénoliques

COMPOSES PHENOLIQUES

Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kaempférol		Fraises

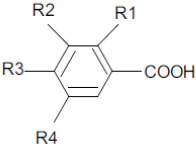
	Isoflavonoïdes	<p>Daidzéine</p> 		Graines de soja
	Anthocyanes	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés	Procyanidol		Raisins, kaki

II.3.1. Les acides phénoliques simples

II.3.1.1. Acides hydroxybenzoïques

- **Sont des dérivés de l'acide benzoïque**
- **Ont une structure générale de base de type (C6-C1)**
- **Existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides**
- Les acides hydroxybenzoïques, les plus abondants sont répertoriés dans le tableau II :

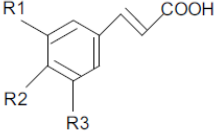
Tableau II: Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

II.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques

- **Dérivent de l'acide cinnamique**
- **Ont une structure générale de base de type (C6-C3)**
- **Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques**
- **Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau III représente les principaux acides hydroxycinnamiques**

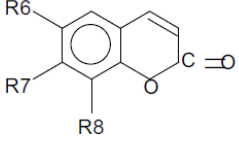
Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

II.3.1.3. Coumarines

- **Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale.**
- **Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique**

Tableau VI : Principaux types de coumarines (Macheix *et al.*, 2005)

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

II.3.2 Les flavonoïdes

II.3.2.1. Généralités

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans la vacuole dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois [Gabor ,1988].

II.3.2.2. Structure

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3.

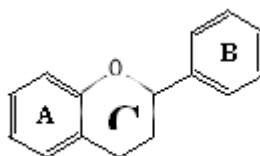


Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes

Généralement la structure des flavonoïdes est représenté selon le système C₆-C₃-C₆ (Emerenciano), en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Narayana, 2001; Malesév et Kuntié, 2007).

II.3.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes (Figure 5). Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle, ils se trouvent in vivo.

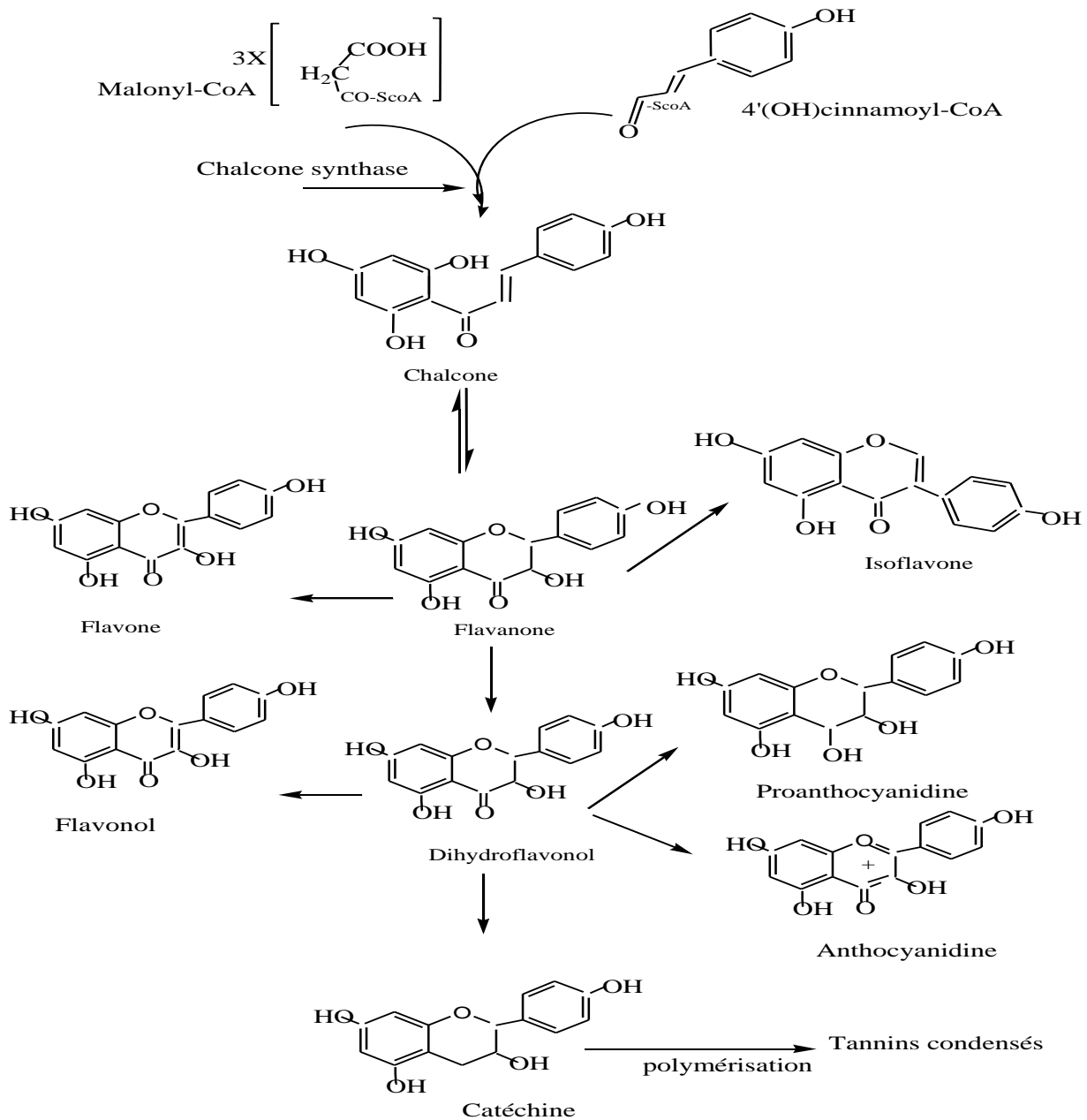


Figure 6: Biosynthèse des flavonoïdes (Merghme, 2009)

II.4. Facteurs de variabilité de la teneur en polyphénols

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

II.4.1 Effet variétal

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

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

II.4.2. Effet de la transformation technologique

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

Comme indiqué précédemment, la localisation des composants dans les matières végétales devient importante lorsque les tissus, comme les pelures et les téguments sont séparés des autres composants au cours du traitement. Cela peut réduire le niveau de composés antioxydants (composés phénoliques) des certains produits alimentaires transformés, alors que le rendement des sous-produits de transformation contiennent encore des taux substantiels des composés phénoliques (Kalt, 2005), comme par exemple le son de blé est riche en acide férulique (5 mg/ g) (Scalbert et Williamson, 2000), ce qui signifie que la teneur en acide férulique de la farine de blé est donc directement liée à des niveaux de tamisage (Manach *et al.*, 2004).

II.4.3 Conditions de culture

II.4.3.1 Lumière du soleil

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

II.4.3.2 Température

Le stress imposé par la température a des conséquences importantes pour l'agriculture (Lewitt, 1980). D'une part, Une conséquence bien connue des températures élevées dans les plantes est le dommage oxydative causée par un déséquilibre thermique induit par la photosynthèse et la respiration. La limitation de la photosynthèse peut augmenter le taux de formation d'oxygène actif dans les chloroplastes ou d'entraver l'activité de défense antioxydante.

Des formes actives d'oxygène (par exemple, $O^{\cdot 2}$) attaquent une variété de composants cellulaires, elles provoquent la peroxydation des lipides et par conséquent des blessures membranaires, la dégradation des protéines, l'inactivation des enzymes ; la décoloration des pigments et la perturbation des brins d'ADN. Le mécanisme de défense antioxydant est une partie de l'adaptation au stress de chaleur et sa force est en corrélation avec l'acquisition de la thermotolérance. Il est prouvé que l'effet antioxydant est principalement dû à des composés phénoliques. Les composés phénoliques sont souvent régulés à la hausse en réponse aux stress épisodes. Certains d'entre eux ont un rôle de protection en raison de leurs propriétés antioxydantes et sont fortement corrélés avec la capacité de piégeage des radicaux libres (Mohammad *et al.*, 2007).

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

II.4.3.3 Stress hydrique

Les tissus végétatifs de la plupart des plantes sont sensibles au déficit hydrique et ne peuvent pas persister dans les périodes de faible disponibilité en eau (Farrant *et al.*, 2009). Plusieurs

variétés et géotypes d'espèces cultivées de blé sont capables de montrer des degrés variables de tolérance à la sécheresse dans les tissus des végétaux à travers l'évolution des mécanismes tels que l'efficacité de meilleure utilisation de l'eau et/ou l'ajustement osmotique qui décline les dommages associés à la perte d'eau (Moore *et al.*, 2008).

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

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

II.4.4. Effet de stockage

L'entreposage peut également influencer sur le contenu des polyphénols qui sont facilement oxydés. Les réactions d'oxydation conduisent à la formation de substances plus ou moins polymérisées qui conduisent à des changements dans la qualité des aliments, en particulier dans la couleur et les caractéristiques organoleptiques (Kondakova *et al.*, 2009). Les résultats de stockage de la farine de blé marquent une perte d'acides phénoliques. Après 6 mois de stockage, les farines contenant les mêmes acides phénoliques, en termes qualitatifs, mais leurs concentrations sont moins de 70% (Manach *et al.*, 2004).

II.5. Compartimentage ou localisation dans la plante

La distribution des phénols dans les plantes, les tissus et les cellules n'est pas uniforme (Atanasova et Ribarova, 2009). La distribution des composés phénoliques préformés antifongiques

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

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

III. Effet du stress hydrique sur le développement des plantes

III.1. L'eau et la plante

Parler de l'eau chez les végétaux est quelque chose de commun. Chacun sait que pour se développer une plante a besoin d'eau et quand celle-ci vient à manquer les conséquences peuvent être graves (Bernard, 2006). Elle s'y trouve naturellement à l'état liquide, mais aussi sous forme de vapeur d'eau dans les chambres sous-stomatiques des feuilles (Laberche, 2004).

Les rôles multiples assurés par l'eau au sein des plantes en font le premier facteur limitant leur fonctionnement. Parmi ces rôles (Laberche, 2004):

- L'eau contribue au maintien de la structure de la cellule et en particulier de la structure colloïdale du cytoplasme.
- Elle est le siège des réactions métaboliques. Elle intervient dans les réactions métaboliques comme l'hydrolyse ou la photosynthèse. Elle est donc en ce sens un aliment pour le végétal.
- Elle permet la turgescence des cellules et par là même des tissus et des organes.
- Elle véhicule les nutriments minéraux et les produits du métabolisme.
- Elle emprunte à la plante sa chaleur latente de vaporisation par son rejet dans l'atmosphère sous forme de vapeur. Elle permet à celle-ci d'être supportée les rayonnements solaires et les divers échauffements climatiques.
- Elle permet le déplacement des anthérozoïdes chez les Thallophytes, les Ptéridophytes, les Bryophytes et les Préspermaphytes.

III.2. Notion de stress

Selon les définitions, le stress chez les plantes apparaît avec des significations différentes en biologie, qui convergent principalement en attribuant le stress à n'importe quel facteur environnemental défavorable pour une plante (Levitt, 1980). Tsimilli-Michael et *al.* (1998) considèrent que le stress a une signification relative, avec un contrôle comme état de référence. Ils considèrent le stress comme une déviation du contrôle à une contrainte. Selon Jones et *al.* (1989) un stress désigne à la fois l'action d'un agent agresseur et les réactions qu'il entraîne dans l'organisme agressé, une force qui tend à inhiber les systèmes normaux. D'autre part, les stress environnementaux nés de la fluctuation des facteurs abiotiques (sécheresse, salinité, température) affectent les conditions de croissance, le développement et le rendement des plantes (Madhava Rao et *al.*, 2006).

III. 3. Le stress hydrique

Le stress hydrique est l'un des stress environnementaux les plus importants, affectant la productivité agricole autour du monde (Boyer, 1982). Il existe de nombreuses définitions du stress hydrique. En agriculture, il est défini comme un déficit marqué et ce compte tenu des précipitations qui réduisent significativement les productions agricoles par rapport à la normale pour une région de grande étendue (Mckay, 1985 in Bootsma et *al.* 1996). En effet, on assiste à un stress hydrique lorsque la demande en eau dépasse la quantité disponible pendant une certaine période ou lorsque sa mauvaise qualité en limite l'usage (Madhava Rao et *al.* 2006). Le stress hydrique entraîne une dégradation des ressources d'eau douce en termes de quantité (surexploitation des eaux souterraines, rivières asséchées, etc.) et de qualité (eutrophisation, pollution par la matière organique, intrusion saline, etc.) (Mouhouche et Boulassel, 1997).

Le stress hydrique peut se définir comme le rapport entre la quantité d'eau nécessaire à la croissance de la plante et la quantité d'eau disponible dans son environnement, sachant que la réserve d'eau utile pour la plante est la quantité d'eau du sol accessible par son système racinaire (Laberche, 2004). La demande en eau de la plante est quant à elle déterminée par le niveau de transpiration ou évapotranspiration, ce qui inclut les pertes d'eau tant au niveau des feuilles qu'au niveau du sol (Laberche, 2004). Le stress hydrique est toute restriction hydrique qui se traduit par une baisse de potentiel de la plante suite à une perturbation de son activité physiologique provoquée par un déficit de consommation en eau et communément appelé stress hydrique (Mouhouche et Boulassel, 1997).

III.4. Effet du déficit hydrique sur le blé

Outre son rôle dans la photosynthèse, dans le transport et l'accumulation des éléments nutritifs ainsi que dans la division cellulaire et la régulation thermique, l'eau joue un rôle essentiel dans la croissance et le développement des plantes cultivées (Riou, 1993). Un déficit hydrique se traduit par une réduction de la croissance de la plante et/ou de sa production par rapport au potentiel du génotype. Un déficit hydrique précoce affecte en parallèle la croissance des racines et des parties aériennes, le développement des feuilles et des organes reproducteurs (Debaeke *et al.* 1996).

Le déficit hydrique peut engendrer des pertes de rendement à n'importe quel stade de développement du blé. Chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.), en région méditerranéenne, la sécheresse est une des causes principales des pertes de rendement, qui varient de 10 à 80% selon les années (Nachit *et al.*, 1998).

III.5. Mécanismes d'adaptation à la sécheresse

La tolérance d'une plante à une contrainte hydrique peut être définie, du point de vue physiologique, par sa capacité à survivre et à croître et, du point de vue agronomique, par l'obtention d'un rendement plus élevé que celui des plantes sensibles (Slama *et al.* 2005).

Il existe une large gamme de mécanismes de tolérances à la sécheresse qui ne sont pas exclusifs les uns des autres et qui peuvent même être complémentaires (Jones *et al.* 1980). Ces mécanismes sont d'ordre phénologique, morphologique et physiologique.

Ainsi, la tolérance du blé à la contrainte hydrique peut être associée à une précocité d'épiaison (Makhlouf *et al.* 2006), à un système racinaire abondant (Hurd, 1974; Passioura, 1983), à une fermeture rapide des stomates, à une grande efficacité d'utilisation de l'eau (Green et Read, 1983) ou au maintien d'un potentiel de turgescence élevé (Kreim et Kronstad, 1981; Morgan et Gordan, 1986).

IV. Phytothérapie

IV.1 Définition

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces.

IV.2. Différents types de la Phytothérapie

- **Aromathérapie : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.**
- **Gemmothérapie : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique des tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racinelles.**
- **Herboristerie : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée. Elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.**
- **Homéopathie : Elle a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive. Les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.**
- **Phytothérapie pharmaceutique : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (Strang, 2006).**

IV.3. Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (Iserin *et al.*, 2001).

V. Activité antibactérienne et antifongique

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

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

V.1. Activité antibactérienne

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites. La plupart des bactéries possèdent une paroi glucidique, le peptidoglycane. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la tuberculose... (Nauciel, 2000).

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (gram positif et gram négatif) basés sur la différence de la structure de la composition chimique de la paroi cellulaire

Parmi les grams positifs, une espèce *Staphylococcus aureus* tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales. Alors que pour le gram négatif, on rencontre les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

- *E coli* est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers.

- *Pseudomonas aeruginosa* se caractérise par la pigmentation bleue verte de ses colonies et possède une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques (Nauciel, 2000).

V.2. Activité antifongique

Les champignons sont des végétaux dépourvus de chlorophylle, devant trouver leur carbone dans les composés organiques, ce qui conditionne souvent les circonstances de leur vie sprophytique ou parasitaire. En fonction de leur habitat, les champignons sont répartis en deux groupes : les endogènes et les exogènes.

Les champignons endogènes sont représentés essentiellement par *Candida albicans*, cette levure vit normalement et de façon exclusive dans le tube digestif de l'homme et de certains animaux (Lysette Bossokpi, 2003).

Certains composés phénoliques antibiotiques sont stockés dans les cellules des plantes comme des formes liées inactives, mais sont facilement convertis dans la plante en antibiotique biologiquement active par hydrolyse enzymatique (glycosidases) en réponse à une attaque pathogène. Ces composés peuvent également être considérés comme des composés antimicrobiens préformés depuis les enzymes de la plante qui activent entre eux. Ils sont déjà présents, mais sont séparés de leurs substrats par le compartimentage, permettant l'activation rapide sans exigence pour la transcription des nouveaux produits géniques. Dans de tels cas, les composés phénoliques libres sont susceptibles d'être beaucoup plus toxiques pour l'organisme

Envahisseur que les formes liées. En outre, même si les composés phénoliques préformés antifongiques sont présents dans les plantes en bonne santé à des niveaux qui devraient être antimicrobiens, leurs niveaux pourraient encore augmenter, en réponse au défi par des agents pathogènes (Lattanzio *et al.* 2006).

I. Matériel végétal

Dans cette expérimentation, trois variétés de blé dur (*Triticum durum*) sont étudiées Haurani, Hedba et Guemgum Rkhem (Tableau V)

Tableau V: Les principales caractéristiques des variétés choisies

Variété de blé dur	Abréviation	Origine	Caractéristiques
Haurani	Hau	Syrie	Tallage faible, semi, précoce, courte, tolérante à la sécheresse.
Hedba	Hed	Algérie (Est)	Tardive, tallage moyenne, tolérante à la sécheresse, modérément sensible aux maladies, paille haute.
Guemgoum Rkhem	GGR	Algérie (Ouest)	Tardive, adapté, modérément aux maladies, grain très long, qualité.

I.1. Préparation de la matière végétale

La préparation de la matière végétale est l'étape réalisée sous la serre de chaabat Arsas au Biopole ; laboratoire de Développement et Valorisation des Ressources Phytogéniques.

Le semis des trois variétés était effectué le 15 janvier 2014 dans des pots ronds, contenant environ 3kg du sol argilo-limoneux. Cinq graines de chaque variété de blé dur ont été ensemencées avec une moyenne de nef répétition pour étudiés deux plans, les composés phénoliques à l'état normal (sans déficit hydrique SDH) et les composés phénoliques avec déficit hydrique (ADH) (Figure 7).

Les plantules sont irriguées une fois par semaine durant les premiers stades de la vie de la plante avec 1/4 de la capacité au champ. Au stade quatre feuilles, on partage l'essai à deux traitements : les premiers pots sont irrigués deux fois par semaine. Alors que les pots restants, on subit l'arrêt d'arrosage par application du stress hydrique. Les trois variétés ont été récoltées pendant le stade montaison à deux différents états SDH et ADH.

Variétés / stades	Haurani	Hedba	GGR
SDH	13 Avril 2014	13 Avril 2014	13 Avril 2014
ADH	20 Avril 2014	20 Avril 2014	20 Avril 2014

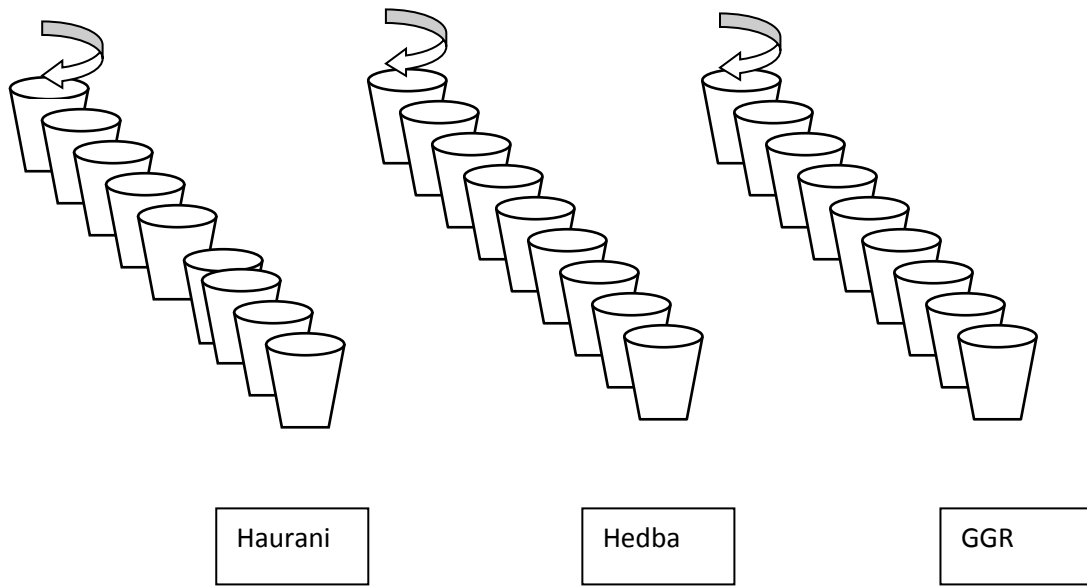


Figure 7: Dispositif expérimental du semis

II. Etude des polyphénols

II.1. Dosage des polyphénols (Aspect quantitatif)

Toutes les manipulations sont réalisées aux laboratoires : 1 et 2 de biologie et physiologie végétale, et le labo de biochimie.

Le dosage des phénols totaux permet d'identifier la teneur de ces composés dans 1g de matériel végétal. La réalisation de cet aspect est faite suivant ces étapes.

II.1. 1. Protocole d'extraction

La macération est une technique qui consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant, pour extraire les principes actifs comme les composés phénolique.

La solution éthanolique d'extraction (éthanol/eau ; 50/50) est préparée. Pour les céréales, il est préféré d'utiliser l'éthanol pour la macération (Yu et al, 2002), ou éthanol-eau avec différentes proportion (Pathirina, 2003) Que 50ml de cette solution est utilisée pour broyer à l'aide un mortier 1g de feuilles fraîches de chacune des trois variétés de blé dur Le mélange est macéré pendant 24 heures. Ensuite, il est filtré et récupéré dans des fioles afin de les décanter toute une nuit. L'extrait obtenu est évaporé à sec grâce au Rotavapor Buchi (évaporateur rotatif) à 50 °C. Les résidus secs sont récupérés par 5ml d'eau distillée dans des tubes à assai.

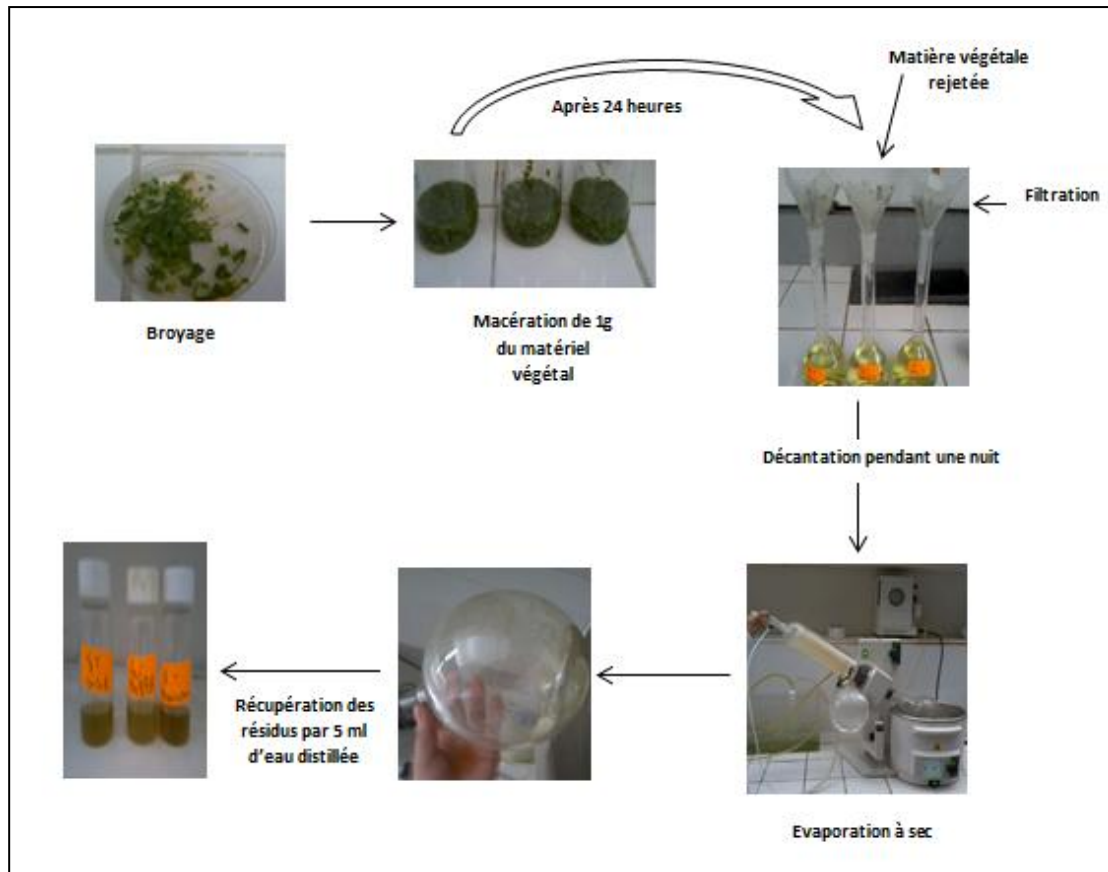


Figure 8 : Protocole de préparation de l'extrait phyto-éthanolique

II.1. 2. Protocole de dosage

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singlaton Rossai (Ragae et Noaman, 2006). Le réactif de folin-ciocalteu réagit avec la fonction $-OH$ des phénols (Catalano et franco, 1999). Cette réaction se traduit pour donner une couleur bleu foncée.

Afin de quantifier les phénols totaux dans la matière végétale, l'extrait phyto-éthanolique est pris dans des tubes à essai en ajoutant deux réactifs :

- 1 ml de l'extrait éthanolique végétal,
- 5 ml de folin-ciocalteu 10%
- 4 ml de carbonate sodium $Na_2 CO_3$ (75g/l)

Un témoin est préparé par les mêmes réactifs sauf que l'extrait végétal est remplacé par l'éthanol.

La solution obtenue est incubée dans 20°C pendant une heure. Après, elle est diluée selon le rapport 1/5 par la solution éthanolique 50%. L'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 765nm .

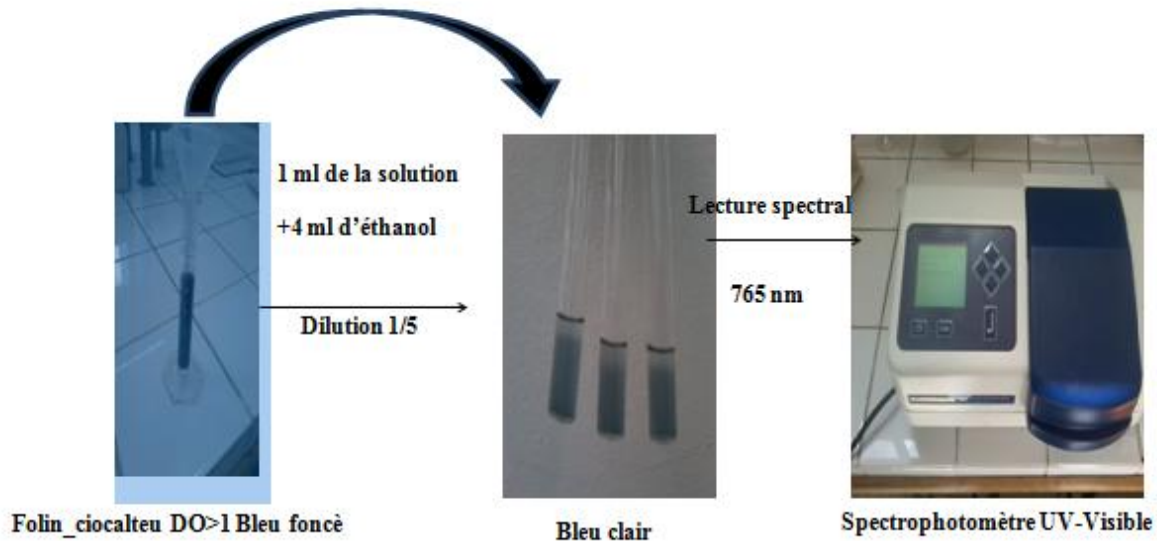


Figure 9 : Mesure de l'absorption

II.1.3. Calcul des teneurs

L'acide gallique est pris comme un standard son absorbance en fonction de sa concentration est illustrée par l'équation suivante : $y=0,795x+0.033$ (y est la densité optique **DO** ; x est la concentration qui lui convient) (Bousmid, 2011). En remplaçant y par la densité optique mesurée « $x=(y-0.033)/0.795$ », on obtient les concentrations «**C (mg/ml)**» des polyphénols chacun des extraits variétaux. Ensuite, pour avoir la teneur de polyphénol «**T (mg/g)**» dans un gramme de matière végétal, l'application de l'équation suivante est adéquate : $T=C.V/m$ (**V** : le volume de l'extrait avant l'évaporation à sec ; **m** : la masse de la matière première=1g pour toutes les variétés).

II.2. Extraction, identification et séparation des composés phénoliques (Aspect qualitatif)

II.2.1. Extraction

La partie aérienne du végétal restante de la première macération pesée, puis macérée dans la solution hydro-alcoolique (éthanol/eau ; 50/50). Le rapport du matériel végétal/solution hydro-alcoolique est de 1/10 ml/g (Marston et Hostettmann, 2006). Le tableau IV indique la quantité de la matière végétale utilisée pour les deux traitements.

Tableau IV: quantité de la matière végétale macérée.

phases	SDH			ADH		
	Hau	Hed	GGR	Hau	Hed	GGR
Poids	6,09	6,94	6,01	7,18	8,83	5,32

La durée de cette macération est longue par rapport à la première car elle dure 72 heures successives avec renouvellement du solvant chaque 24 heures en récupérant à chaque fois l'extrait issu de la filtration. Après que cette solution est décantée pendant une nuit à fin d'éliminer les boues, elle sera passée à l'évaporation rotatif. Les résidus secs sont dissous dans 100 ml de l'eau distillée pour tout récupérer.

II.2.2. Affrontement entre solvants (partition entre solvants)

L'affrontement est la partition entre solvant. Les extraits déjà obtenus sont affrontés par divers solvants organiques en commençant par le moins polaire au plus polaire. Le volume de l'extrait végétal est mesuré et mis dans une ampoule à décanter, puis le même volume du solvant est ajouté. Ensuite, le mélange est agité énergétiquement en laisse sortir à chaque fois le gaz émis des produits.

II.2.2.1. Ether de pétrole

Après l'ajout de l'Ether de pétrole l'extrait végétal, le mélange repose pendant 24 heures afin de permettre ce solvant à éliminer le maximum des graisses et des pigments qui probablement dévient notre futurs résultats. La décantation conduit à avoir deux différentes phases :

La phase d'éther en haut est riche en composés non phénoliques (phase rejetée) : caroténoïdes, chlorophylles a et b et les graisses végétales.

La phase aqueuse en bas contient les composés phénoliques ou le reste des flavonoïdes (phase récupérée)

II.2.2.2. Ether diéthylique

Le même volume de la phase organique issue est affronté avec le même volume d'ether diéthylique. Après une agitation énergétique, la séparation est faite après près de deux. La solution obtenue est laissée reposer deux heures, ce qui permet à l'obtention de deux phases :

La phase d'ether diéthylique en haut contient ether et polyphénols simples (phase récupérée).

La phase aqueuse en bas contient les flavonoïdes (phase récupéré).

II.2.2.3. Acétate d'éthyle

Le même procédé est suivi. Ce solvant sert à extraire les mono-o-glucosides et partiellement les di-o-glucosides. Les deux phases sont récupérées.

II.2.2.4. Butanone

Ce solvant tire les mêmes composés que l'acétate d'éthyle. La même procédure est suivie pour la récupération des deux phases.

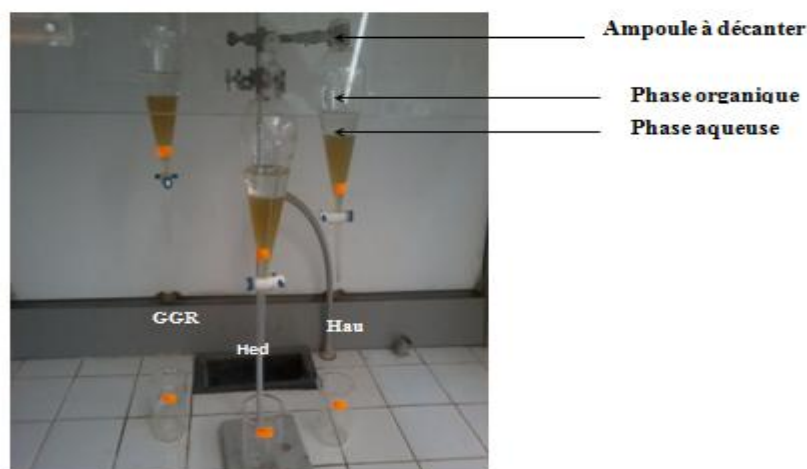


Figure 10 : Déroulement d'un affrontement

Et tout, les affrontements conduisent à l'obtention de quatre phases lesquelles phase Ether diéthylique, phase acétate d'éthyle, phase butanone, et la phase aqueuse ou résiduelle (H_2O). Toutes les phases sont évaporées à sec à $50^{\circ}C$ sauf la phase Ether diéthylique car le solvant s'évapore à l'air libre (Merghem, 2009). La récupération des résidus est effectuée par 5ml de méthanol. Les solutions méthanoliques servent à des analyses spectrale et chromatographique.

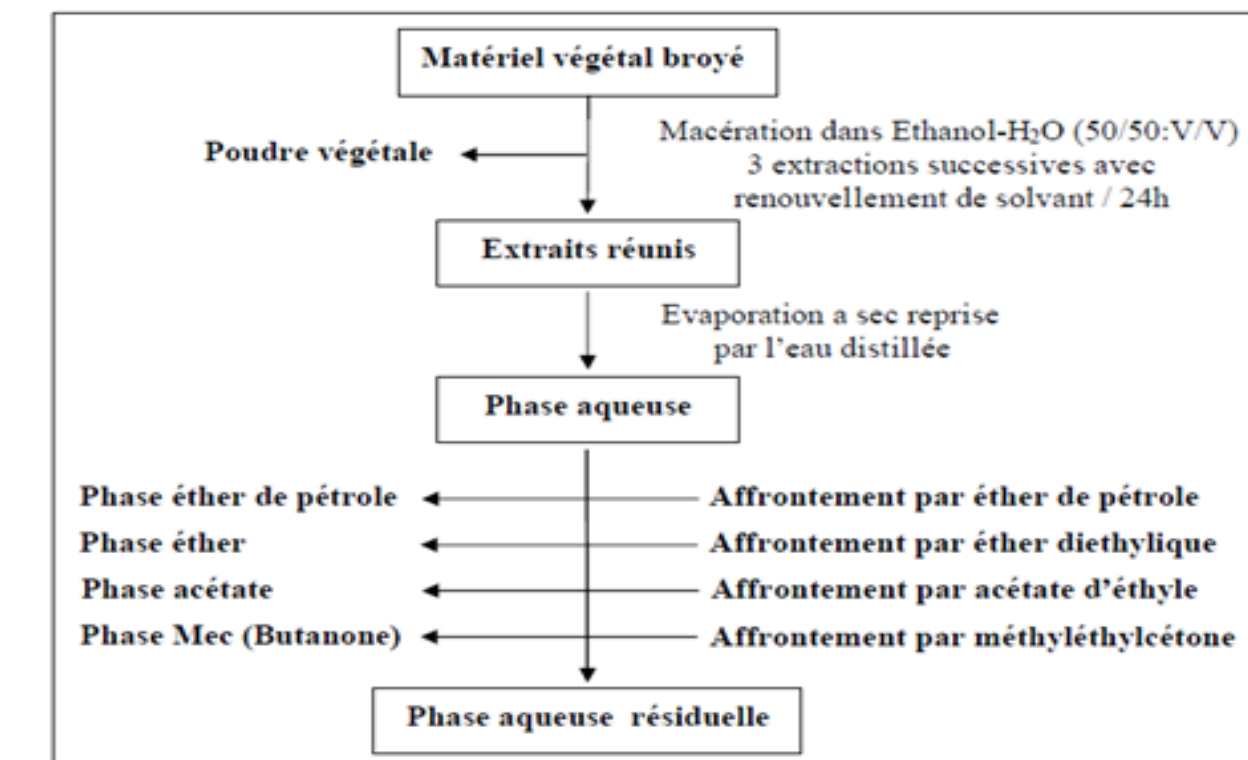


Figure 11 : L'extraction des polyphénols (Merghem, 2003)

II.3. Identification

A cause de la grande diversité des composés phénoliques, leur séparation et identification sont nécessaires pour une analyse. Le spectrophotomètre UV-Visible et la chromatographie sur couche mince CCM sont les techniques utilisées pour cette analyse.

II.3. 1. Spectrophotométrie UV-Visible

II.3. 1.1. Principe

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

II.3. 1.2. Analyse spectrale des phases

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier dans l'intervalle de 220 à 400 nm.

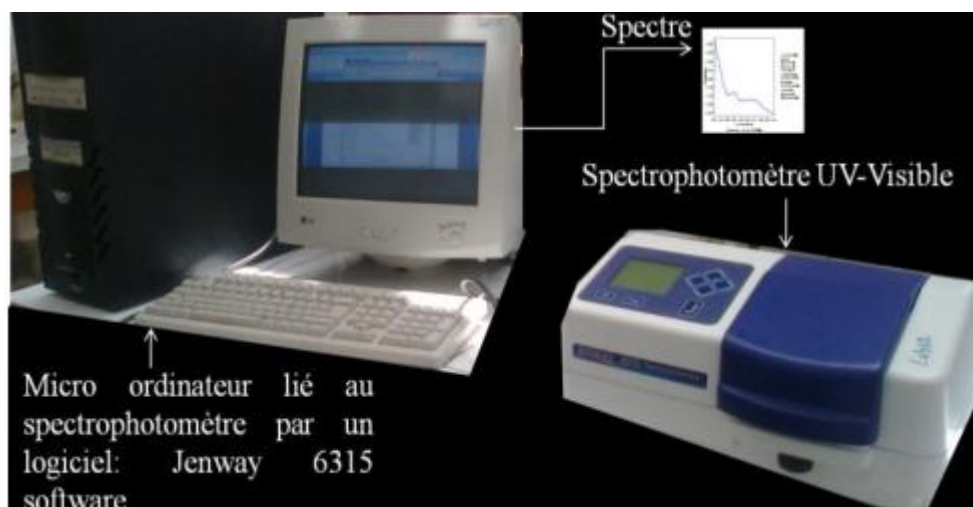


Figure 12: L'appareillage de l'analyse spectrale

II.3. 2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince est une méthode utilisée pour la séparation des substances colorées (d'où son nom). Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives.

II.3. 2.1. Définition et appareillage.

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 μm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.

- l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

II.3. 2. 2. Principe de la technique.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.

Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

II.3. 2.3. Protocol suivi pour la réalisation du CCM

Les plaques utilisées sont en verre (20/20 cm et 20/10).

➤ Le système choisi

Pour les phases Ether diéthylique, Acétate d'éthyle et Butanone, Le système utilisé est : Toluène/Butanone/Méthanol/Ether de pétrole (4/3/3/5).

La CCM de la phase aqueuse est réalisée par le système solvant choisi : Eau distillé/Butanol/Ethanol/Acétone (50/20/25/2).

➤ Préparation de la cuve à élution

L'éluant est versé jusqu'à une hauteur de 1cm dans une cuve à éluant. Il faut bien fermer la cuve pour qu'elle soit saturée en vapeur de l'éluant.

➤ Préparation d'un capillaire

Au laboratoire, les capillaires sont préparés au départ de pipettes Pasteur:

- Chauffer la partie centrale de la pipette dans la flamme d'une torche au propane en tournant le tube jusqu'à ce qu'il soit mou.
- Retirer de la flamme et étirer la pipette.

- Laisser refroidir et couper la partie fine du milieu.

- **Préparation de la CCM**

- On trace un trait à environ 1 cm du bord inférieur de la plaque.
- On marque les futurs dépôts, espacés d'environ 0.5 cm.
- On identifie chaque produit qu'on fera éluer.

- **Dépôt de l'échantillon.**

Le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. La solution est déposée en un point de la plaque. Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible ; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

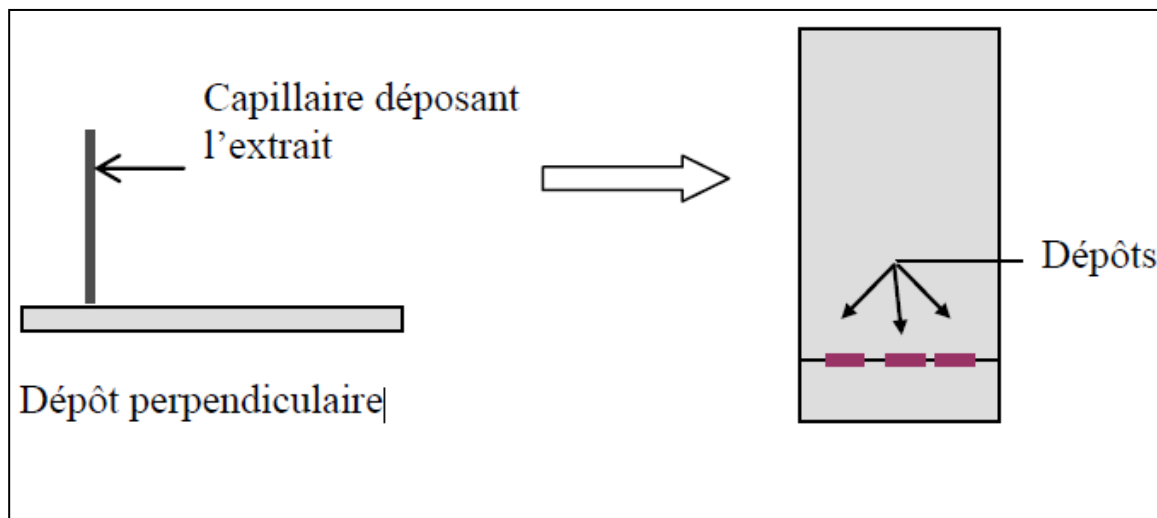


Figure 13: Mode de dépôt pour une CCM (akroum, 2011).

- **Développement de la plaque.**

Chaque plaque est déposée en position verticale dans une cuve. Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

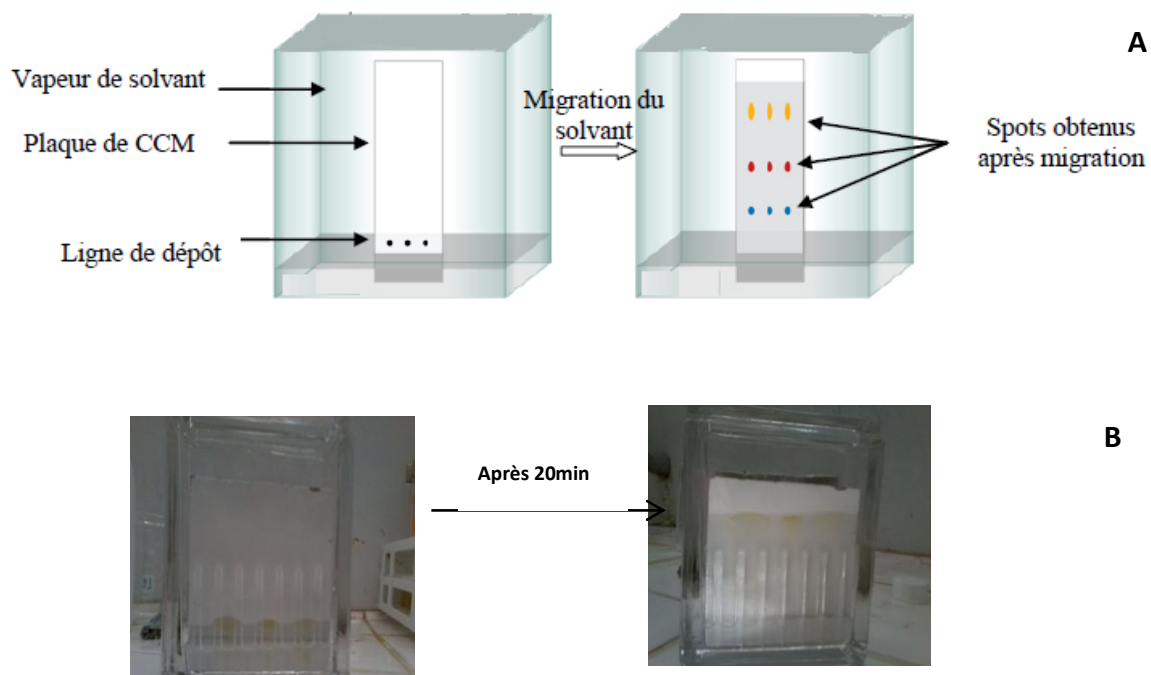


Figure 14 : développement du chromatogramme

A : schéma récapitulatif du développement du chromatogramme

B : développement du chromatogramme de la phase aqueuse

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir ou dans un étuve à 80° C pendant 3 à _ minutes. Après qu'elles sont bien séchées, les distances parcourues par les différents spots sont mesurées.

II.3. 2.4. Révélation.

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : radiations UV, fluorescence, iode et ou pulvérisation par certains réactifs (réactif de Neu, acide acétique, acide sulfurique, mélange de réactifs....etc.)

les méthode utilisées pour nos échantillons sont les radiation UV et la pulvérisation par l'acide sulfurique (H₂ SO₄).

Les radiations UV sont faites à l'aide d'une lampe à UV de 254 nm dans une chambre noire.



Figure 15: Lampe à UV (254 nm)

La pulvérisation des plaques est effectuée par : acide sulfurique, acide acétique et eau distillé (4/80/16). Les plaques sont bien séchées dans une étuve ou par un séchoir.

II.3. 2.5. Calcul du rapport frontal

Le rapport frontal est rapport entre la distance parcourue par un soluté dans une phase stationnaire et la distance parcourue, dans le même temps, par une /des taches. La valeur de R_f est définie par la relation :

$$R_f = \text{Distance parcourue par la substance} / \text{Distance parcourue par le front de solvant}$$

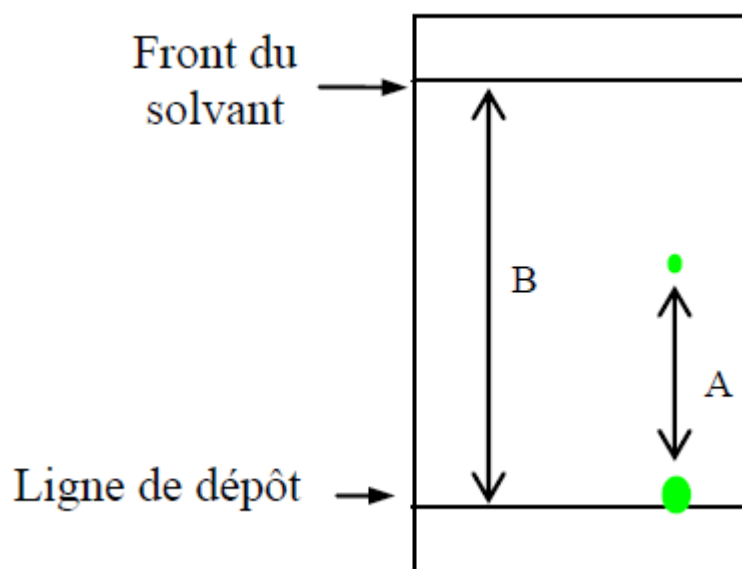


Figure 16 : Le rapport frontal (R_f) (Akroum, 2011)

A : représente la distance entre l'origine (le dépôt) et la tâche du produit.

B : représente la distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant

III. Activités antibactérienne et anti fongique

III.1. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque en papier de wattman n°4.

Les deux bactéries utilisées sont l'*Escherichia coli* et *Bacillus*

Pour tester l'activité antifongique, les champignons choisis sont *Fusarium*.

III.1.1. Préparation des disques

Une feuille de papier de wattman (N°4) est coupée en disque de 6mm de diamètre.

III.1.2. Préparation du milieu nutritif

- Pour les bactéries, le milieu nutritif utilisé est le Muller-Hinton qui était déjà préparé.
- Pour les champignons, le milieu de culture utilisé est le milieu Sabouraud.

III.1.3. Stérilisation du matériel

Le milieu de culture et les disques en papier Wattman enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

III.1.4. Préparation des boîtes

Après que la paille soit nettoyée par de l'eau de javel et que le bec benzène soit allumé de sorte que la flamme sera bleue. Le nom de la variété, le nom de l'espèce bactérienne ou fongique sont écrits aux fonds des boîtes de pétri. Les géloses (Hinton et Sabouraud) sont fondues dans un bain marie à 100°C. Lorsque la température du milieu liquéfié atteint 45°C, il est coulé dans les boîtes jusqu'au moins de sa moitié. Après le remplissage, les boîtes doivent être entrouvertes devant la flamme en attendant la solidification de la gélose.

III.1.5. Ensemencement et dépôt des disques (Activités antibactériennes)

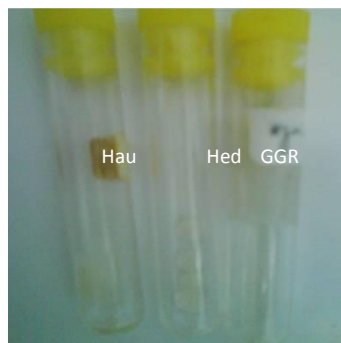
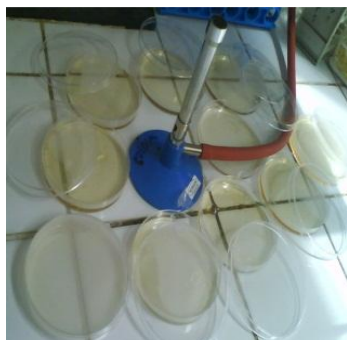
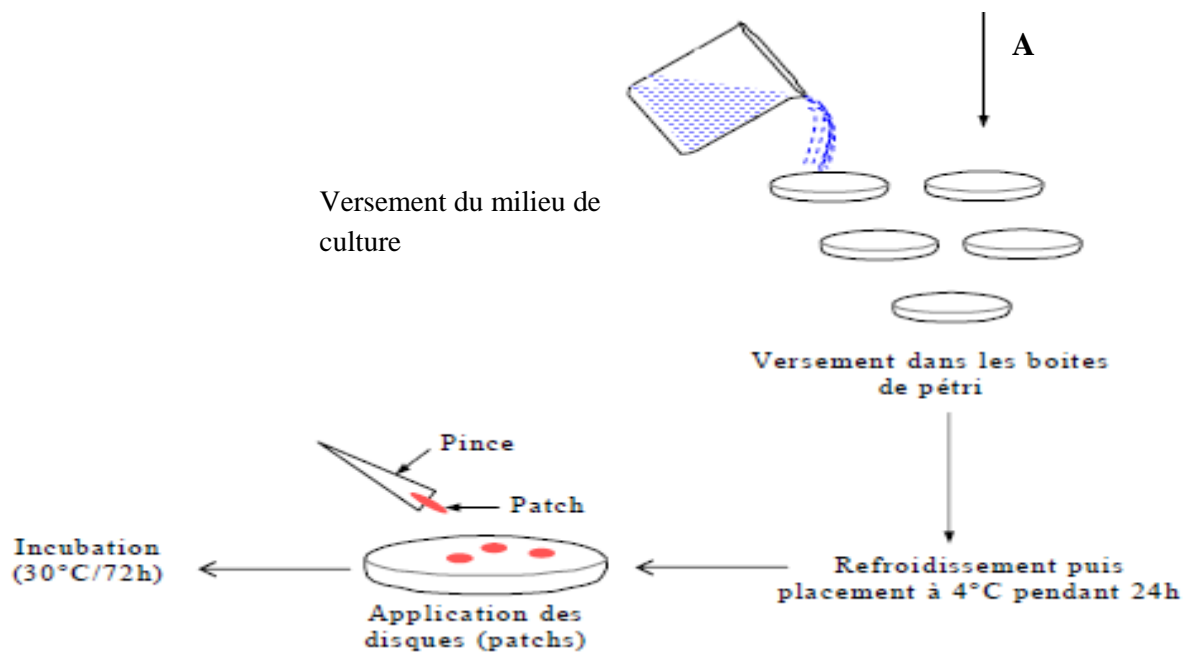
L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, L'écouvillon est Frotté sur la totalité de la surface gélosée.

L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile (quatre disques et deux puits chaque boîte de pétri).

III. 2. Activités antifongique

On a déposés dans les boîtes pétrie le saboro, juste après transformé en liquide. Après son aséchement on la piqué avec la pipette pasteur un puis central. On a déposés 4 disques imprégné d'extrait méthanolique au moyenne de écouvillon après la voir imprégné de champignon on a assuré la rotation sur les disques on a fermé les boîtes pétrie à l'aide d'un scotche.

Les boîtes ensemencées sont incubées 48 heures pour les bactéries et 72heures pour les champignons à 37°C.

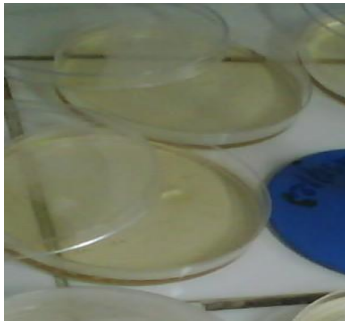


B

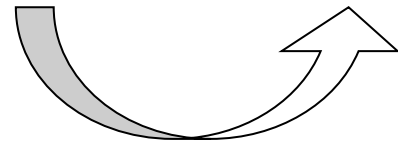


Solidification du milieu

Patchs imprégnés



Après 48 h d'incubation



Étalement de la suspension

Dépôt des disques imbibés

Figure 17: Etapes du test de l'activité antimicrobienne

A : Schéma récapitulatif du test de l'activité antimicrobienne (Akroum 2011),

B : déroulement des étapes de l'activité antibactérienne

III.3. Mesures des zones d'inhibition

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse comme il est indiqué dans la **figure**.



Figure 18: Mesure du diamètre de zone d'inhibition

VI. Etude statistique

Les résultats obtenus en aspect qualitatif et quantitatif ont été traités par le logiciel Excel stat version 2014.

Le test réalisé est l'ANOVA à deux facteurs, suivi par un test de comparaison des moyennes par Newman-Keuls (SNK) à un seuil 95% de confiance.

I. Dosage des polyphénols (Aspect quantitatif)

Les teneurs en polyphénols totaux varient chez les trois variétés de blé dur au stade montaison au traitement SDH de $41,86 \pm 15,91$ mg/g équivalent acide gallique (eq AC) à $23,24 \pm 2,42$ mg/g eq AC. La valeur maximale est enregistrée chez la variété Hau. Alors que la valeur minimale est enregistrée chez la variété Hed. La variété GGR marque une teneur intermédiaire de $37,20 \pm 8,87$ mg/g eq AC. Par contre, au traitement ADH, les teneurs en polyphénols varient chez les trois variétés de $46,28 \pm 12,93$ mg/g eq AC chez GGR comme teneur maximale à $13,07 \pm 4,10$ mg/g eq AC chez Hed comme valeur minimale. La variété Hau marque une teneur intermédiaire de $29,24 \pm 4,46$ mg/g eq AC.

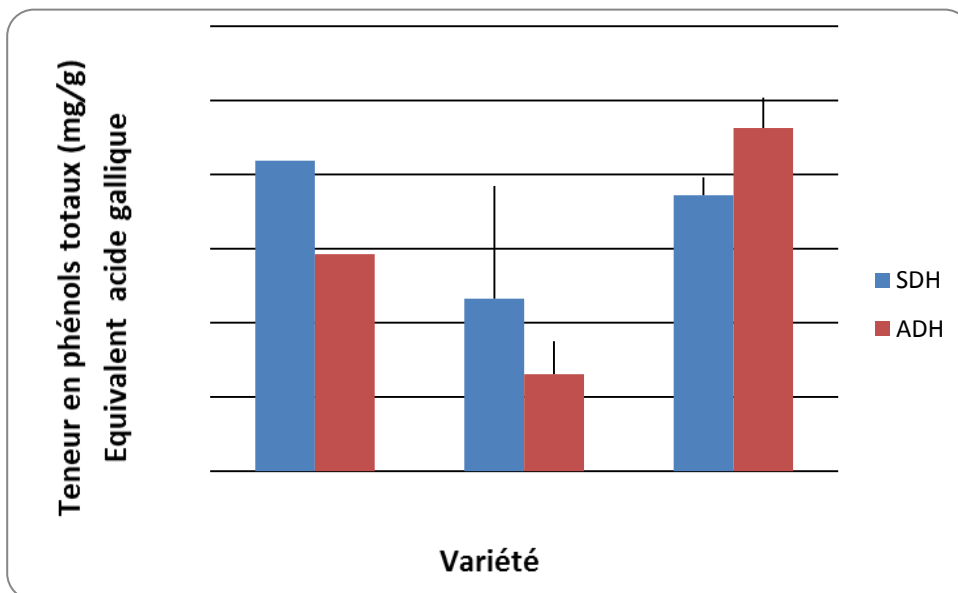


Figure 19 : Teneur en polyphénols chez les trois variétés de blé dur aux deux traitements SDH et ADH.

Par rapport aux teneurs enregistrées chez les variétés étudiées aux deux traitements, les Polyphénols totaux diminuent au traitement ADH de 1/4 et la moitié chez les deux variétés Hau et Hed respectivement par rapport au traitement SDH. Mais cette teneur augmente légèrement chez la variété GGR de 1/6.

L'analyse de variance à deux facteurs révèle une différence significative entre les trois variétés étudiées. Mais, elle ne reflète aucune différence significative statistiquement entre les deux traitements SDH et ADH.

Selon le teste Newman-keuls (SNK), deux groupes englobent les trois variétés étudiées avec une simple différence entre les moyennes. Le premier groupe comprend les deux variétés GGR et Hau. Le deuxième groupe est présenté par la variété Hed.

$$\text{HED} \leq \text{HAU} \approx \text{GGR} \Leftrightarrow 18,153 \leq 35,512 \approx 41,740$$

Aussi, le test SNK associe les deux traitements dans un seul groupe

$$\text{ADH} \approx \text{SDH} \Leftrightarrow 29,529 \approx 34,075$$

II. Extraction et identification des polyphénols (Aspect qualitative)

II.1 Extraction

La différence des couleurs des phases éther diéthylique, acétate d'éthyle et MEC peut être liée aux différentes concentrations des polyphénols et à leurs types inclus dans chaque phase (Tableau V et VI).

Tableau V: Les phases obtenues après affrontements entre trois solvants successifs
(Traitement SDH)

Phase	Solvants	Durée	Variétés	Couleur	Contenu des phases
SDH	Ether de pétrole		HAU	Jaune verdâtre	Graisse et pigments chlorophyllien et caroténoïde
			HED	Jaune verdâtre	
			GGR	Jaune verdâtre	
	Ether Diéthylique		HAU	Vert clair	Composés phénoliques simples et molécules élémentaire de flavonoïdes.
			HED	Vert++clair	
			GGR	Vert clair	
	Acétate d'éthyle		HAU	Jaune verdâtre clair	Flavonoïdes et Proanthocynidine.
			HED	Jaune verdâtre clair	
			GGR	Jaune verdâtre	
	MEC (butanone)		HAU	Jaune clair	Les même composés que la phase acétate d'éthyle.
			HED	Marron	
			GGR	Jaune	

Tableau VI: Les phases obtenues des affrontements entre trois solvants successifs

(Traitement ADH)

Stade	Solvants	Durée	Variétés	Couleur	Contenu des phases
ADH	Ether de pétrole		HAU	Jaune verdâtre	Graisse et pigments chlorophyllien et caroténoïde et inpurtes (phase rejetée)
			HED	Jaune verdâtre	
			GGR	Jaune verdâtre	
	Ether diethylique		HAU	Vert clair	Composés phénoliques simples et molécules élémentaire de flavonoïdes. (phase récupérée)
			HED	Vert++clair	
			GGR	Vertfoncé	
	Acétate d'ethyle		HAU	Jaune verdâtre clair	Flavonoïdes et Proanthocynidine. (phase récupérée)
			HED	Jaune verdâtre clair	
			GGR	Jaune verdâtre	
	MEC (butanone)		HAU	Jaune clair	Les même composés que la phase acétate d'ethyle. (phase récupérée)
			HED	Marron	
			GGR	Jaune	

Les couleurs des phases sont clairement différentes qui aident à conclure que chaque phase contient quelques composés phénoliques.

Les phases aqueuses résiduelles de ces affrontements sont les phases aqueuses qui sont présentées dans le tableau VII.

Tableau VII: Description des phases aqueuses (Traitement SDH et ADH)

	Variétés	SDH	ADH
H2O (phase aqueuse)	HAU	Marron clair	Marron foncé
	HED	Marron clair	Marron foncé
	GGR	Marron foncé	Marron clair

II.2 Identification

Après les extractions et les partitions entre solvants, les phases éther diéthylique, Acétate d'éthyle, méthyl éthylcétone et H₂O sont évaporées à sec et reprises dans 5 ml de méthanol. Une partie de ces échantillons est consacrée à l'étude spectrale aux épreuves chromatographiques, et aux expériences de dosage d'activité biologique.

II.2.1. Analyse spectrale

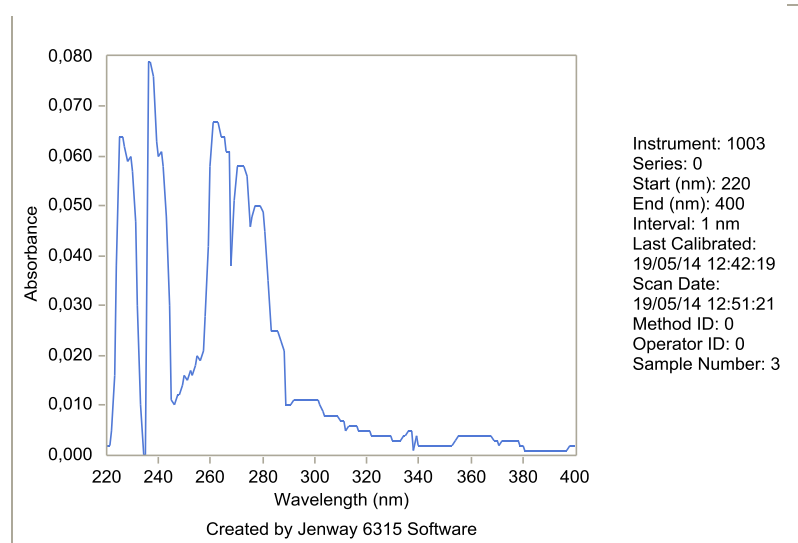


Figure 20 : le spectre du méthanol pur

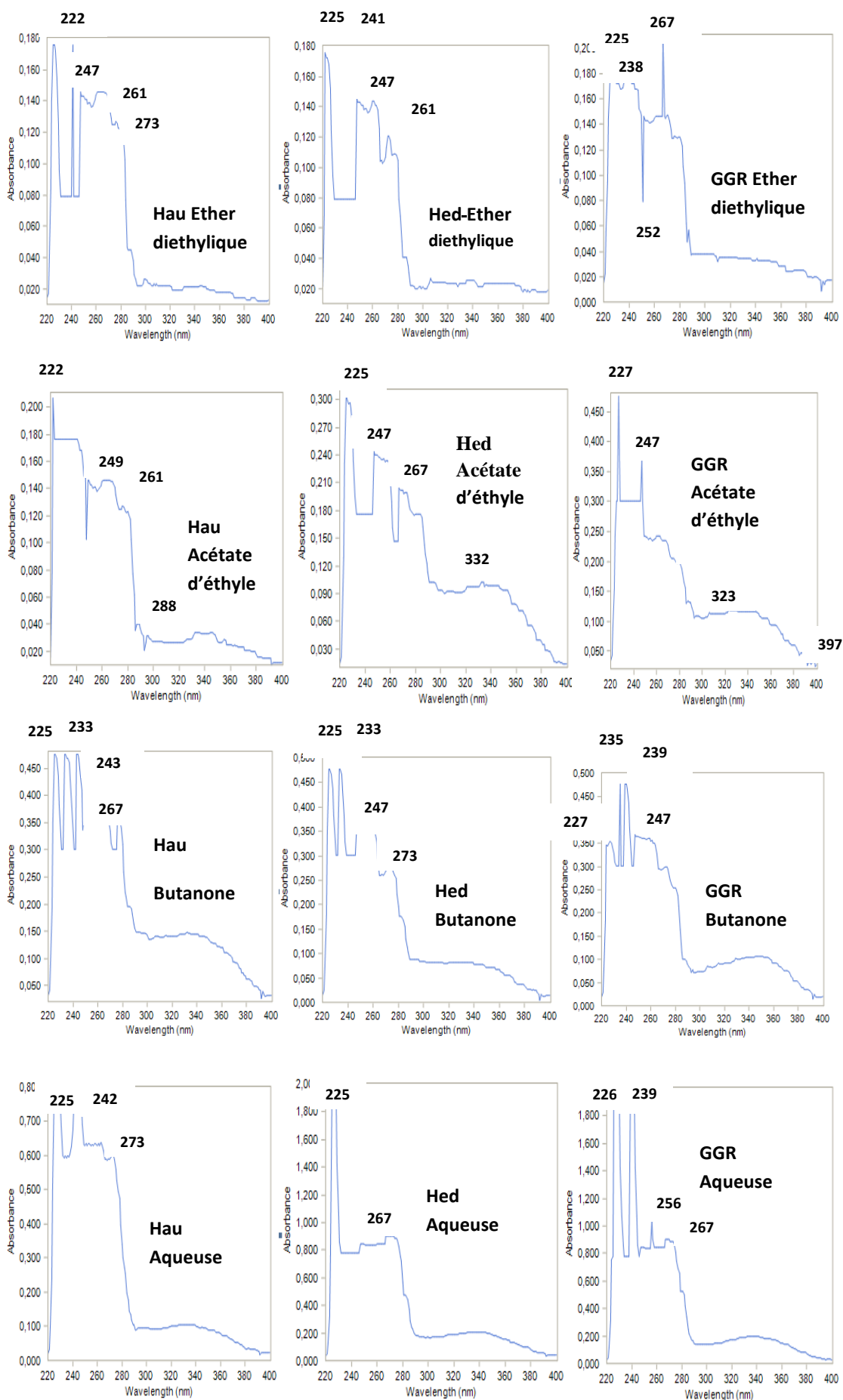


Figure 21 : Spectre d'adsorption des phases des trois variétés de blé dur au traitement SDH

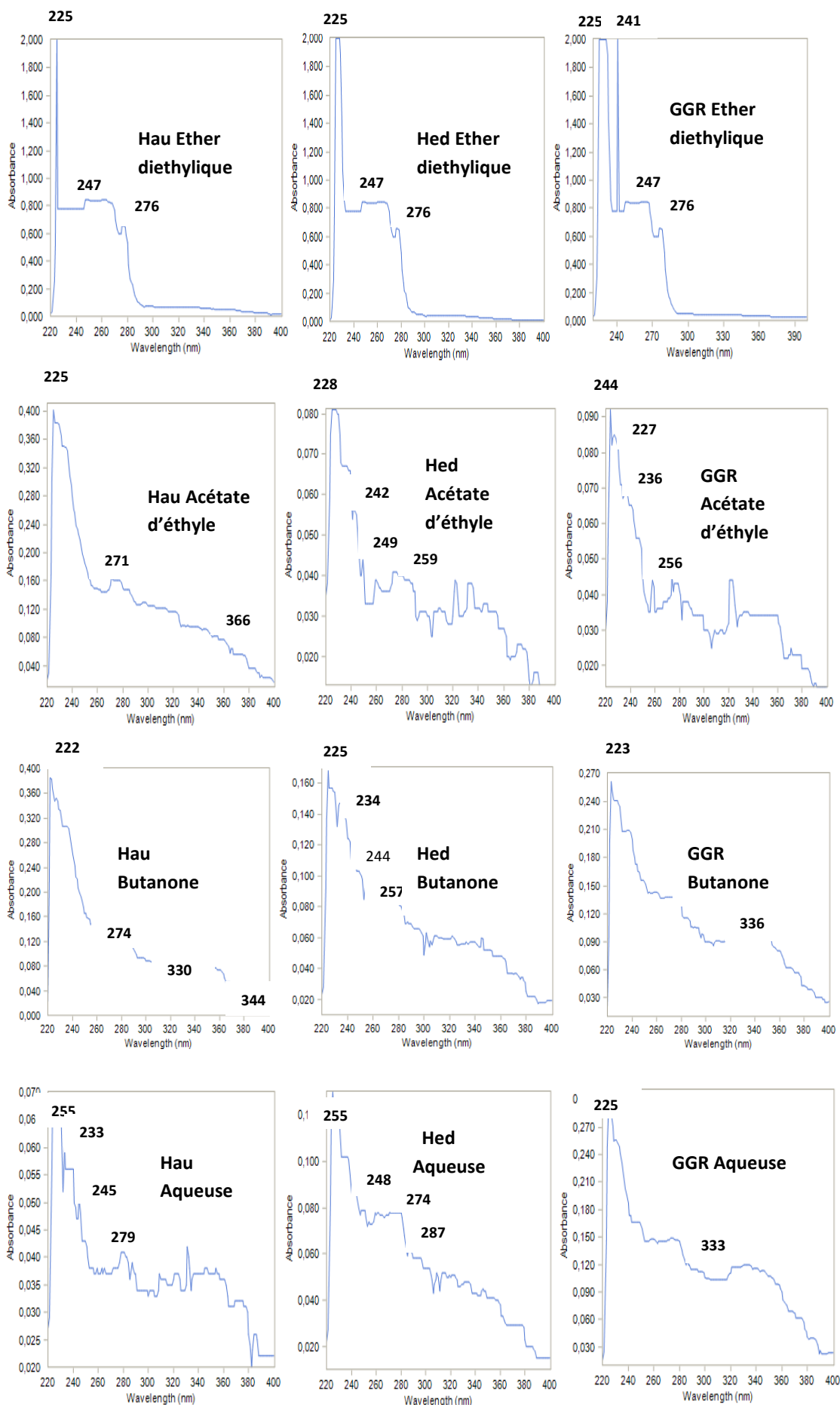


Figure 22 : Spectre d'adsorption des phases des trois variétés de blé dur au traitement ADH

II. 2.1 Analyse Spectrale

Dans l'intervalle UV-Visible, les solutions méthanoliques de la phase éther diéthylique dans les deux traitements SDH, ADH donnent pour la majorité quatre pics situés entre 222 nm et 276 nm.

Ceci nous permet de déduire que cette phase ne contient pas de flavonoïdes et de supposer que peut être ces pics représentent des phénols simples et acides phénoliques.

Les solutions méthanoliques de la phase acétate se sont révélées pour la plupart des solutions flavoniques donnant quatre pics situés dans l'intervalle 222-397 nm. Les spots donnent des pics plus distincts (donc plus purs) qui sont fortement proches à ceux de la phase butanone.

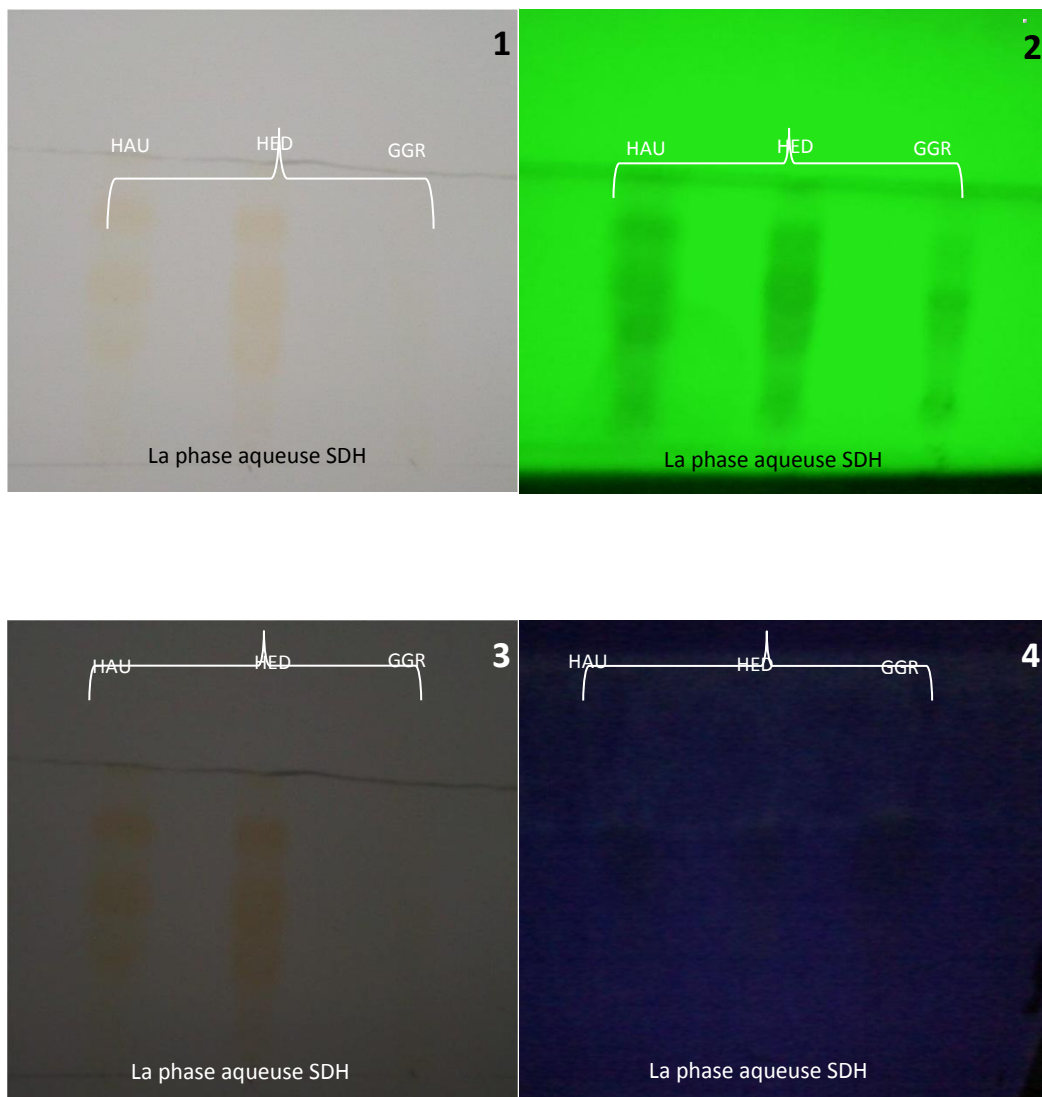
Les deux premiers pics sont révélés dans l'intervalle 222 et 225 nm qui caractérise un phénol simple ou acide phénolique. Les deux autres pics se situent entre 225 et 397 nm. Cet intervalle est caractéristique aux flavonoïdes. Bousmid. (2011) a trouvé qu'après l'analyse spectrale des composés purs des phases Acétate d'éthyle et Butanone, les composés purs de ces phases sont des flavonoïdes. Nos résultats concordent avec ceux de Wagner et Bladt (1996) et Marston et Hostettmann (2006) et Benhabelkader et Siah (2013) qui signalent que les flavonoïdes se révèlent par deux pics ; le premier est entre 230 et 280 nm, le deuxième apparaît aux environs 300 et 385 nm.

II.2.2 Analyse chromatographique

La CCM des extraits méthanoliques est réalisée sur le gel de polyamide avec le système solvant : Tol/MEC/MeOH/EP (4/3/3/5).

Ce dernier permet une séparation des constituants du dépôt pour la phase éther d'éthylique, acétate d'éthyle et butanone. Surtout pour la deuxième qui donne autant de tâches que de produits constituants du dépôt. La phase H₂O est moins bien séparée avec ce système. On refait donc la CCM pour cette phase avec des systèmes à base d'H₂O pour séparer les glycosides qu'elle contient. Le système Choisi est le suivant : H₂O/ Butanol/ EtOH /Acétone : 50/20/50/2. Sous UV dans une chambre noire, on remarque les résultats

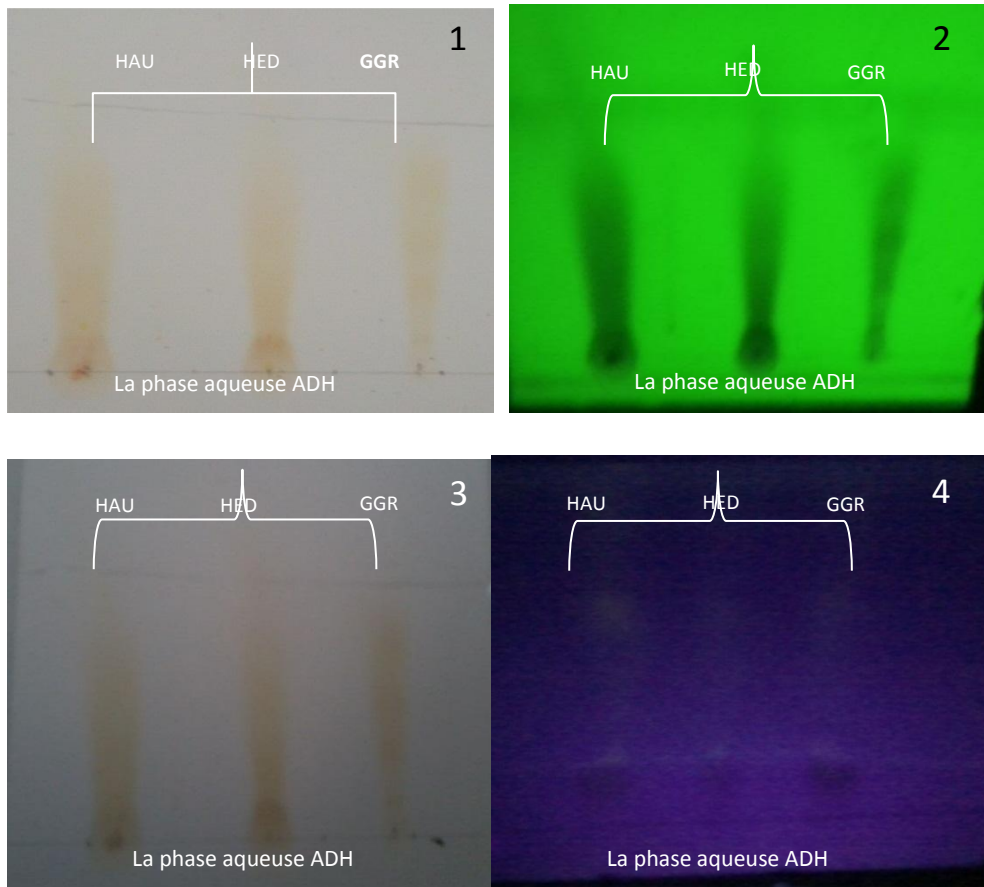
Le front du solvant est marqué dès la sortie des plaques. Après qu'elles sont bien séchées, les distances parcourues par les différents spots sont mesurées. Les résultats obtenus de l'analyse chromatographique sont introduits dans des figures .On note que chaque plaque a quatre photos



SDH : Son déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham.

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique, 4 : UV après la pulvérisation.

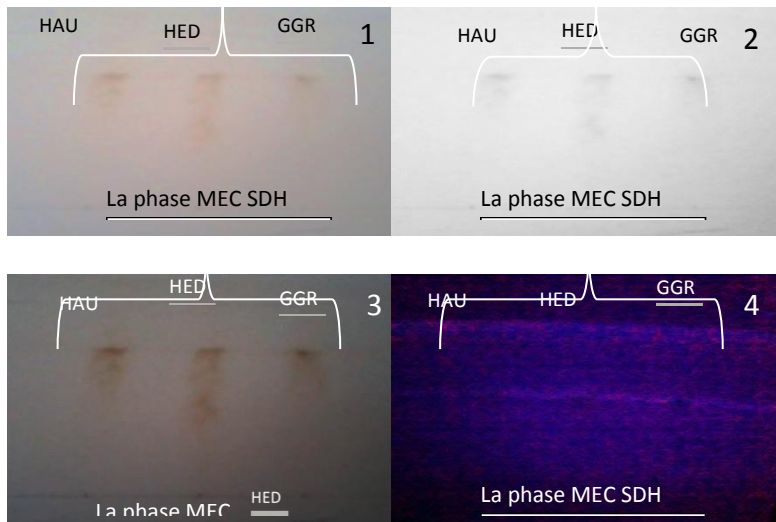
Figure 23: CCM de la phase aqueuse traitement SDH des variétés Haurani, Hedba et GGR, dans le système H₂O distillée / butanol / ETOH (50, 20, 25).



ADH : Avec déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham.

1 : Visible, **2** : sous UV, **3** : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique, **4** : UV après la pulvérisation.

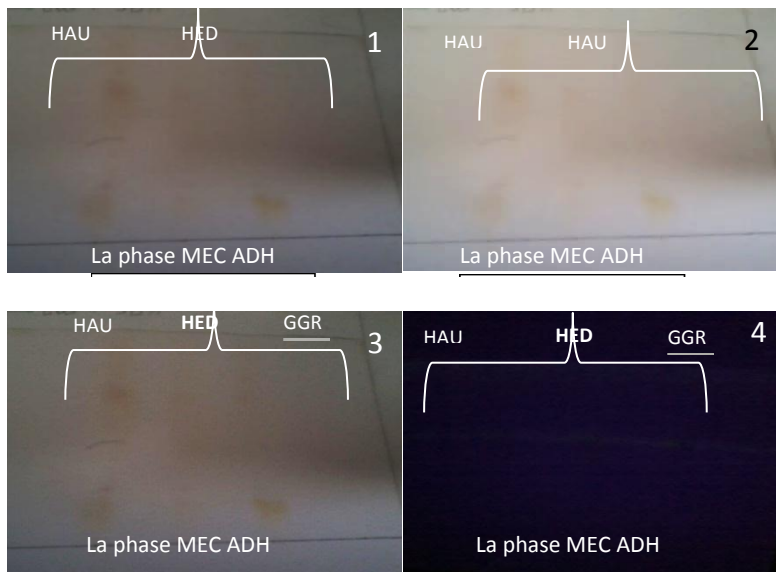
Figure 24 : CCM de la phase aqueuse traitement ADH des variétés Haurani, Hedba et GGR, dans le système H₂O distillée / butanol / ETOH (50, 20, 25).



SDH : Son déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham ; MEC :Méthyle Ethyle Cétone

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique ,4 : UV après la pulvérisation.

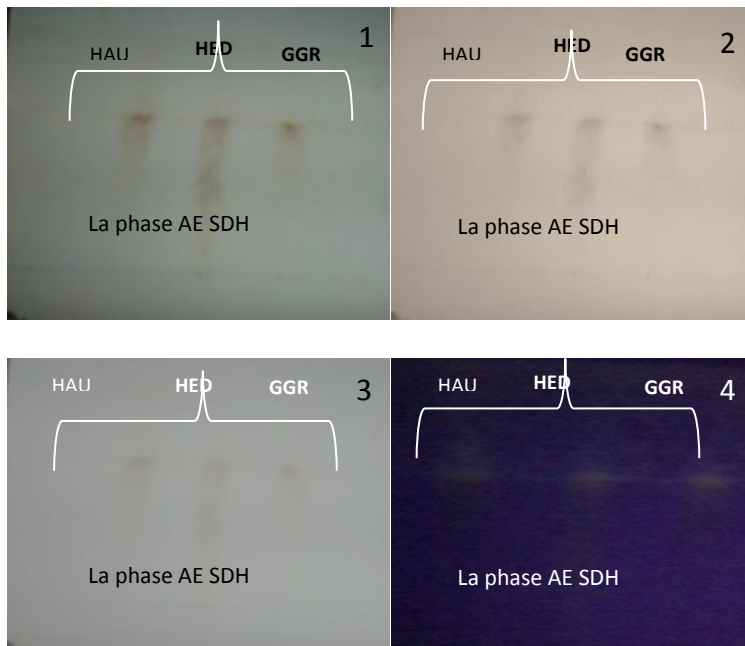
Figure 25: CCM de la phase Méthyle Ethyle Cétone, des variétés Haurani, Hedba et GGR, stad SDH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol (4/3/3/5).



ADH : Avec déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham ; MEC :Méthyle Ethyle Cétone

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique ,4 : UV après la pulvérisation.

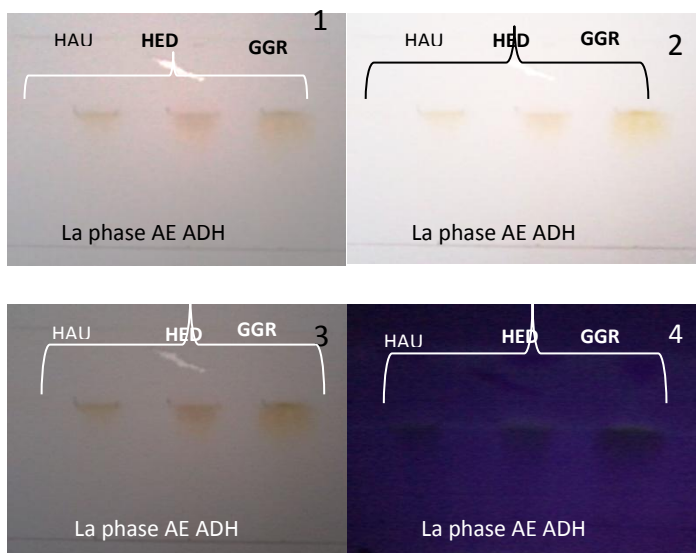
Figure 26: CCM de la phase Méthyle Ethyle Cétone, des variétés Haurani, Hedba et GGR, traitement ADH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol (4/3/3/5)



SDH : Avec déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham ; AE : Acétate D'ethyle

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique ,4 : UV après la pulvérisation.

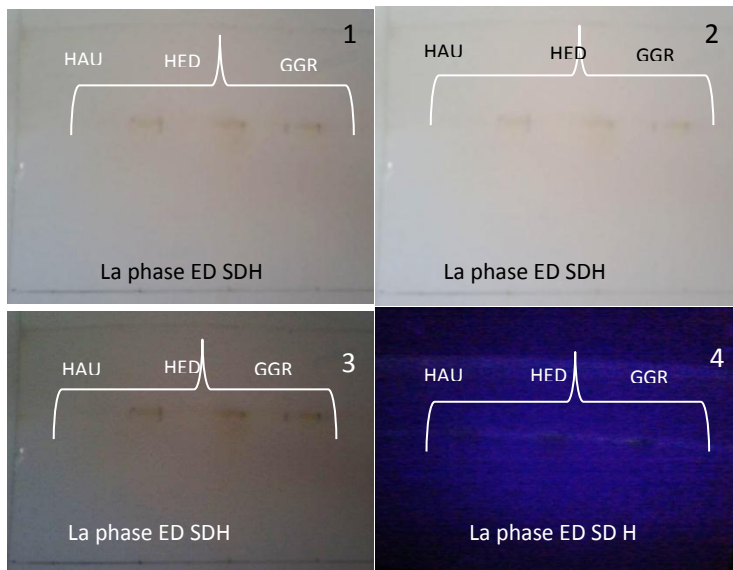
Figure 27: CCM de la phase Acétate D'ethyle, des variétés Haurani, Hedba et GGR, staddans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol (4/3/3/5).



ADH : Avec déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham ; AE : Acétate D'ethyle

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique ,4 : UV après la pulvérisation.

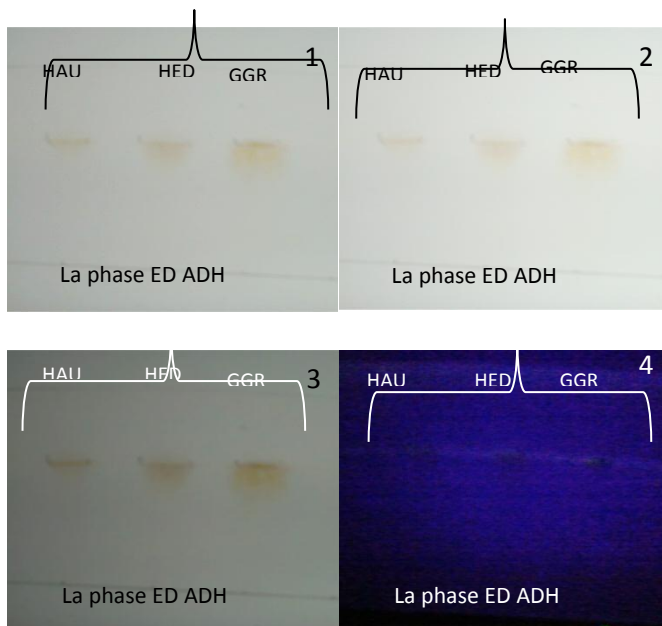
Figure28: CCM de la phase Acétate D'ethyle des variétés Haurani, Hedba et GGRstadeADH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol (4/3/3/5).



SDH : Son déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham ; ED :Ether Diéthylique.

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique ,4 : UV après la pulvérisation.

Figure29: CCM de la phase Ether Diéthylique. Des variétés Haurani, Hedba et GGR, stade SDH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol (4/3/3/5).



ADH : Son déficit hydrique ; HAU : Haurani ; HED : Hedba ; GGR :Guemguoum Rkham ; ED :Ether Diéthylique.

1 : Visible, 2 : sous UV, 3 : Visible après pulvérisation par l'acide sulfurique ,4 : UV après la pulvérisation.

Figure30: CCM de la phase Ether Diéthylique. Des variétés Haurani, Hedba et GGR, stade ADH dans le système Tol /MEC/ETOH/Ether de Pétrol (4/3/3/5).

A l'œil nu, il est très difficile d'identifier toutes les taches. Pour cette raison, les plaques sont passées à la chambre noire pour les visualiser à l'aide de lampe UV et avec une pulvérisation par l'acide sulfurique, acide acétique et l'eau distillée. La révélation a rendu les spots plus remarquables. Ce qui conditionne à les définir. Les résultats sont présentés dans les tableaux VIII et IX.

Tableau VIII : les rapports frontaux des taches apparues dans la CCM (traitement SDH)

variétés	Phase	N° Spots	R _f	Couleurs
HAU	ED	1	0,61	jaune
	AC	2	0,64	Jaune brillant
			0,96	mauve
	MEC	3	0,16	Jaune vert
0,67			Jaune brillant	
H2O	4	0,94	Jaune vert	
		0,16	Blanc	
		0,37	Jaune	
		0,67	Blanc	
HED	ED	1	0,88	orange
			0,63	jaune
	AC	2	0,64	Jaune
			0,96	mauve
MEC	3	0,28	Jaune vert	
		0,51	Jaune	
H2O	3	0,69	marron	
		0,28	Jaune	
		0,51	Jaune vert	
GGR	ED	1	0,69	blanc
			0,63	Jaune vert
	AC	2	0,65	Jaune brillant
			0,96	mauve
MEC	3	0,14	Jaune vert	
		0,68	Jaune	
			0,91	vert
			0,9	Blanc

	H2O	4	0,65 0,77 0,86	Jaune vert Jaune vert orange
--	-----	---	----------------------	------------------------------------

Tableau IX : les rapports frontaux des taches apparues dans la CCM (traitement ADH)

variétés	Phase	N° Spots	R _f	Couleurs
HAU	ED	1	0,73	orange
	AC	1	0,61	jaune
	MEC	1	0,66	Jaune brillant
	H2O	4	0,08 0,27 0,65 0,76	Blanc Jaune Jaune vert orange
HED	ED	2	0,73 0,92	Orange Jaune foncé
	AC	2	0,37 0,67	Orange Jaune foncé
	MEC	2	0,66 0,88	Orange Jaune brillant
	H2O	3	0,06 0,56 0,62	Jaune Blanc orange
GGR	ED	1	0,77	Jaune vert
	AC	2	0,37 0,69	Orange Jaune foncé
	MEC	1	0,66	Jaune brillant
	H2O	3	0,09 0,59 0,65	Jaune Blanc orange

Selon les tableaux VIII et IX, le nombre des spots des phases du traitement SDH est le même par rapport à leur nombre dans le traitement ADH. Le nombre des composés est presque le même.

Les phases Ether Diéthylique ont montré un seul spot coloré, ce qui indique qu'elles sont riches des acides phénoliques et phénol simple aux deux traitements SDH.ADH.

Les phases Acétate D'éthyle ont montré pour la majorité deux spots. Par contre, la phase Butanone enregistre trois spots dans le traitement SDH et un seul spot dans le traitement ADH.

Les phases aqueuses sont riches en flavonoïdes et ont montré pour la totalité des variétés trois quatre spots pour les deux traitements.

On remarque que les rapports frontaux se varient entre 0.61 et 0.96 pour SDH .Ils sont très proches à ceux du stade ADH qui varient entre 0.06 et 0.88 (Tableau X).

Tableau X : les intervalles du R_f pour les quatre phases

Traitements Phases	SDH	ADH
Ether diéthylique	0.61-0.63	0.73-0.77
Acétate d'éthyle	0.64-0.96	0.09-0.37
Butanone	0,14-0.94	0.66-0.88
H ₂ O	0.9-0.88	0.06-0.77

Tableau XI : Relation entre le R_f et la structure (Yaou, 2001)

Structure flavonique	R_f (rapport frontal)
Augmentation des OH	Diminution du R_f dans un solvant lipophile
Glycosylation	R_f augmente dans un solvant aqueux R_f diminue dans un solvant alcoolique.
Hydroxyles méthylés	R_f augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	R_f diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3 -OH libre	R_f nul dans l'eau

D'après le R_F l'identification des flavonoïdes dans chaque phase est possible .Bandykova et Shinkarenko(1973) ont affirmé que les flavonols et flavanones se caractérisent par un R_F situé entre 0.3 et 0.5. Donc, le spot de la phase éther diéthylique de la variété Haurani correspondond à un flavanone ou flavonols. Selon les tableaux VIII, IX, X et XI, les R_F des phases ethér d'iéthylique SDH (0.61-0.63) ADH (0.73-0.77) acétate d'iethyle SDH (0.64- 0.96) ADH (0.09-0.37) et de la plupart des spots de la phase MEC (SDH : 0.14-0.94, ADH : 0.66 - 0.88).

Tableau XII : La relation entre la florescence et la structure des flavonoides (lahouel, 2005)

Spot coloré	Type de flavonoïdes
Noir, Maron	1 { Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8 tris-OH
Brun noire	2 { 3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	3 { Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4' Flavones 6 ou 8-OH, Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu clair (fluorescent)	4 { Flavones sans 5-OH libre Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5- OH libre
Jaune terne, Jaune, Fluorescence orangé	5 { Flavonols 3-OH libre avec ou san 5-OH libre

Jaune vert brillant	6 { 5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	7 { Flavonols avec 3-OH libre Aurones Chalcone Flavanones
Jaune pâle	8 { Dihydroflavonols

Par conséquent et d'après les deux tableaux de VIII et XII, on peut supposer que les phases contiennent les types de flavonoïdes suivant (les numéros du tableau XII sont utilisés dans le tableau XIII pour remplacer les types de flavonoïdes indiqués dans la même ligne).

Tableau XIII : Les flavonoïdes contenus dans les phases de chaque traitement (SDH et ADH)

Traitement \ Phases	SDH	ADH
Ether diéthylique	(6), (5)	(5), (8), (6)
Acétate d'éthyle	(6), (3), (5)	(8), (5)
Butanone	(5), (6)	(6), (5), (1)
H ₂ O	(6), (5)	(5), (6)

On observe qu'il y a quatre groupes des composés phénoliques dans le traitement ADH (1, 5, 6 et 8). Mais, seulement trois groupes au traitement SDH (3, 5 et 6). La phase éther diéthylique et la phase butanone contiennent trois différents groupes. La phase acétate d'éthyle est la plus riche en flavonoïdes car on trouve quatre groupes de ces composés. Il n'y a pas plus de deux groupes de flavonoïdes pour la phase aqueuse.

On peut donc conclure que les deux traitements SDH et ADH contiennent principalement des flavonols et flavones avec des différentes substitutions. Par contre Les phases du SDH sont caractérisées par la présence Les chalcones, flavanones et isoflavones sont exclusivement présent dans la phase acétate d'éthyle du SDH.

III. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est limitée en tester l'activité antibactérienne et antifongique.

On utilise deux techniques (disques et puits)

III.1 Activité antibactérienne

On déduit qu'un tel composé possède une activité antibactérienne seulement si une zone d'inhibition apparaît.

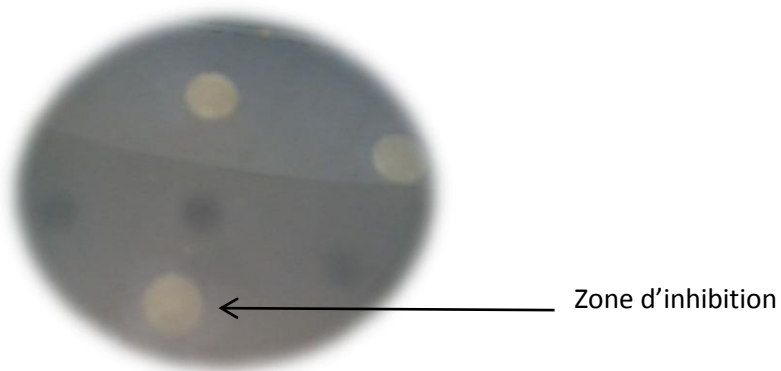


Figure 31 : Présence de la zone d'inhibition

Les résultats du test de l'activité antimicrobienne de la phase d'éthyle Acétate est illustré par la figure 32.

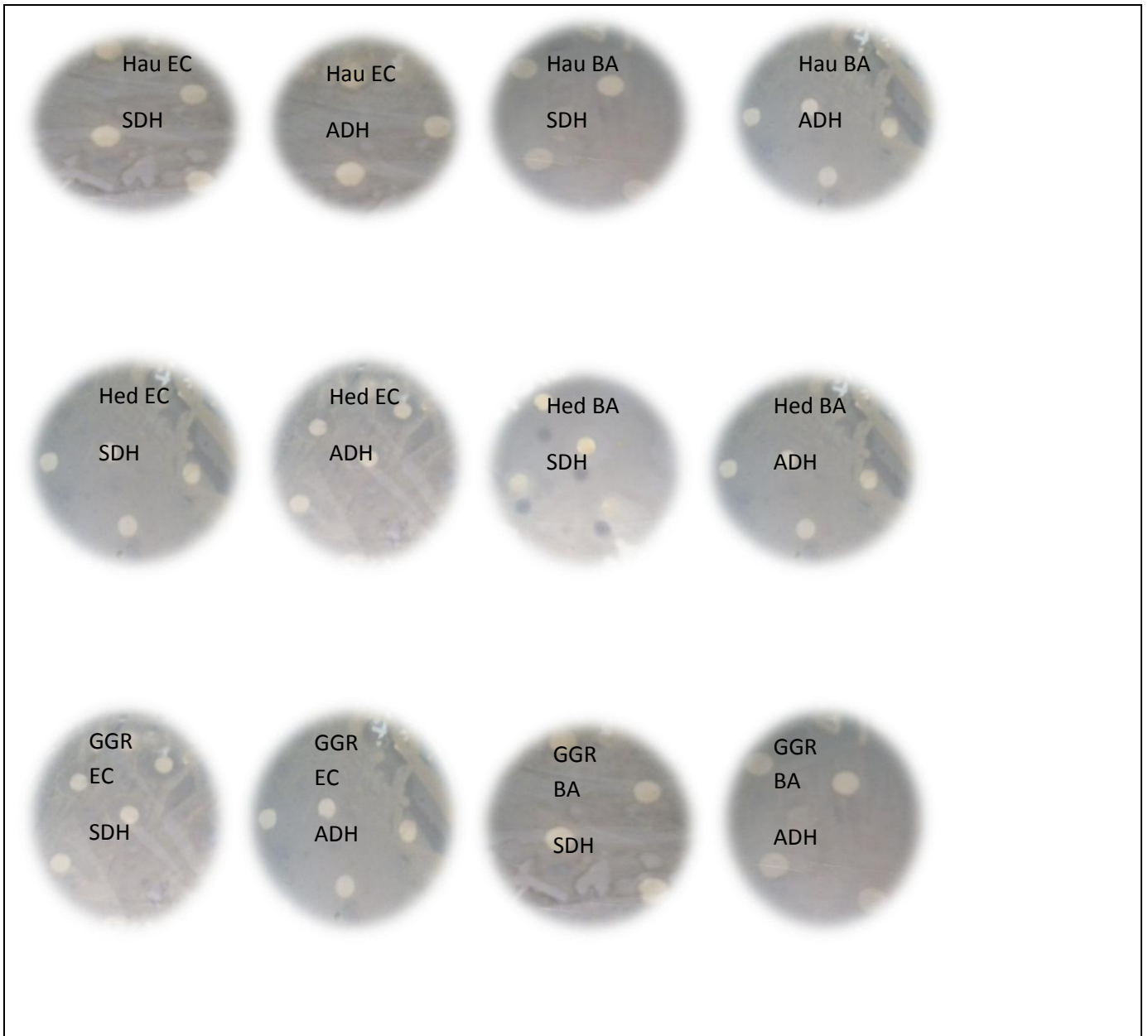


Figure 32 : Les résultats de l'effet de l'extrait des trois variétés du blé dur sur *E-coli* et *Bacillus* aux deux traitements SDH et ADH dans la phase d'éthyle Acétate

III.1.1 Phase D'éthyle Acétate

Disque

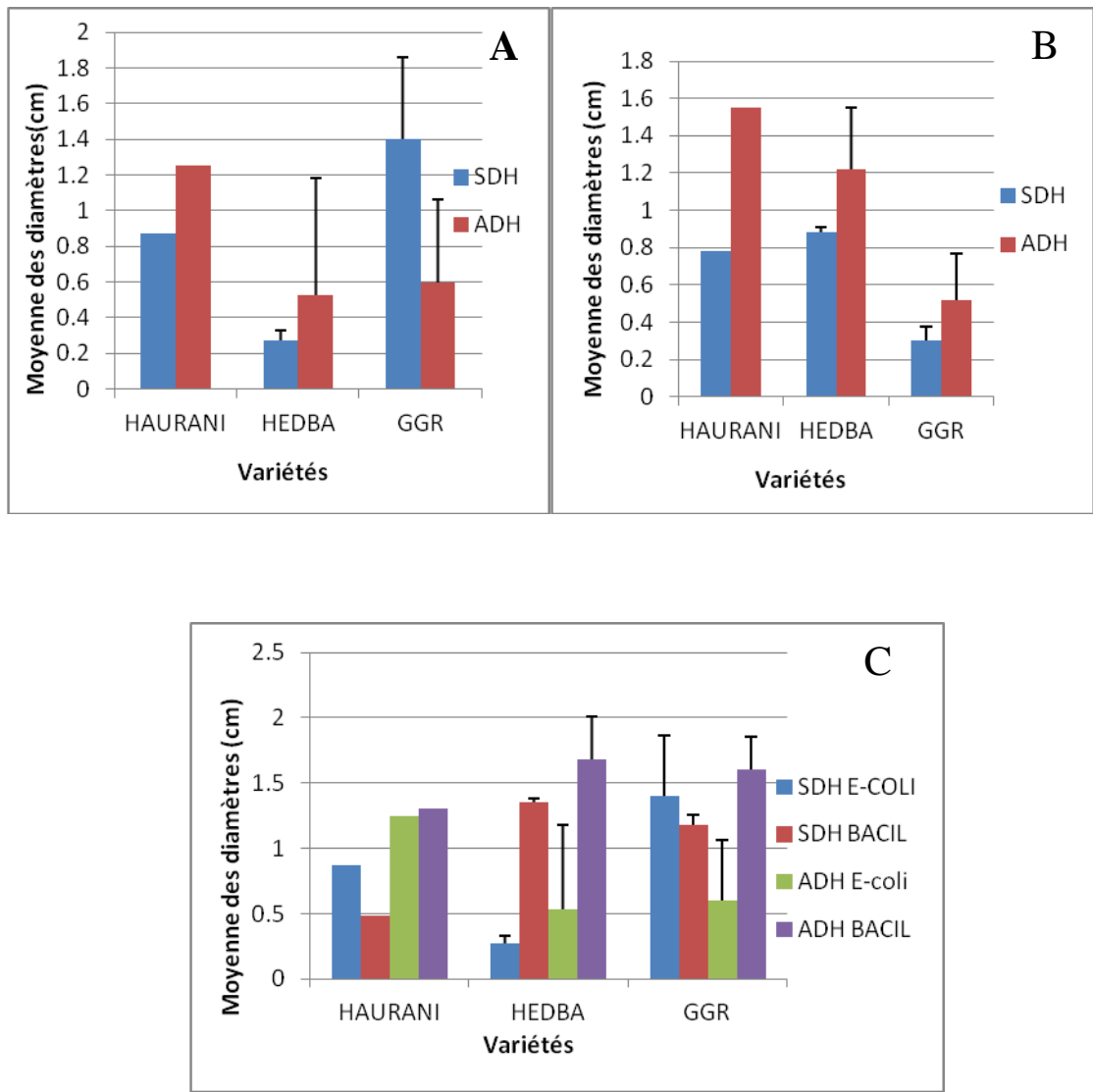


Figure 33 : Zones d’inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase D’éthyle Acétate; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

L’extrait de GGR a l’activité la plus forte contre le développement et la croissance des *E.coli* au traitement SDH avec une moyenne de diamètre des zones d’inhibition de 1.4 ± 0.47 mm suivi par l’extraits Hau avec une moyenne de 0.87 ± 0.06 , et en dernier celui de Hed avec un effet plus faible que l’extraits des autres variétés 0.27 ± 0.46 mm. Par contre, au traitement ADH, l’extrait méthanoliques des deux variétés Hed et GGR ont l’activité la plus vigoureuse avec des moyennes de diamètre des zones d’inhibition de 0.53 ± 0.46 mm et 0.6 ± 0.53 mm successivement. Alor que l’extrait Hau marque la plus faible zone d’inhibition par une moyenne de diamètre de 1.25 ± 0.65 mm. (Figure 33 A)

Aucune différence entre l'effet méthanolique de la phase acétate d'éthyle sur la bactérie E-coli et aussi entre les deux traitements ADH et SDH. (Figure 33)

Selon le test Newman-Keuls (SNK), un seul groupe englobe les trois variétés étudiées avec une simple différence entre les moyennes.

$$\mathbf{HAU \approx GGR \approx HED \leftrightarrow 0,400 \approx 1,000 \approx 1,058}$$

Aussi, le test SNK associe les deux stades dans un seul groupe.

$$\mathbf{ADH \approx SDH \leftrightarrow 0,794 \approx 0,844}$$

L'extrait de Hed a l'activité la plus forte contre le développement et la croissance des *Bacillus* au traitement SDH avec une moyenne de diamètre des zones d'inhibition de 0.88 ± 0.08 mm suivi par l'extrait Hau avec une moyenne de 0.78 ± 0.3 mm, et en dernier celui de GGE avec un effet plus faible que l'extrait des autres variétés 0.3 ± 0.52 mm. Par contre au traitement ADH, les extraits méthanoliques des deux variétés Hed et Hau ont un effet remarquable avec des moyennes de diamètre des zones d'inhibition de 1.22 ± 0.25 mm et 1.55 ± 0.03 mm successivement. Tandis que l'extrait GGR exerce un faible effet d'inhibition mesuré par 0.52 ± 0.45 mm (Figure 33 B)

L'analyse statistique signifie une différence significative entre l'effet des extraits des trois variétés sur la bactérie *Bacillus* et aussi une différence hautement significative entre les deux traitements SDH et ADH.

Le test SNK classe les variétés étudiées en deux groupes : Hau et Hed présentent le premier groupe et GGR présente le deuxième groupe.

$$\mathbf{GGR < Hed \approx Hau \leftrightarrow 0,408 < 1,050 \approx 1,198}$$

Alors que les extraits du traitement ADH ont un effet plus puissant que celui des extraits du traitement SDH

$$\mathbf{SDH < ADH \leftrightarrow 0,677 < 1,094}$$

Comparaison entre les deux bactéries

L'analyse statistique ne révèle aucune différence entre l'effet des extraits méthanoliques de la phase acétate d'éthyle sur les deux bactéries dans la technique des disques et le même effet sur les deux traitements SDH et ADH. (Figure 33 c)

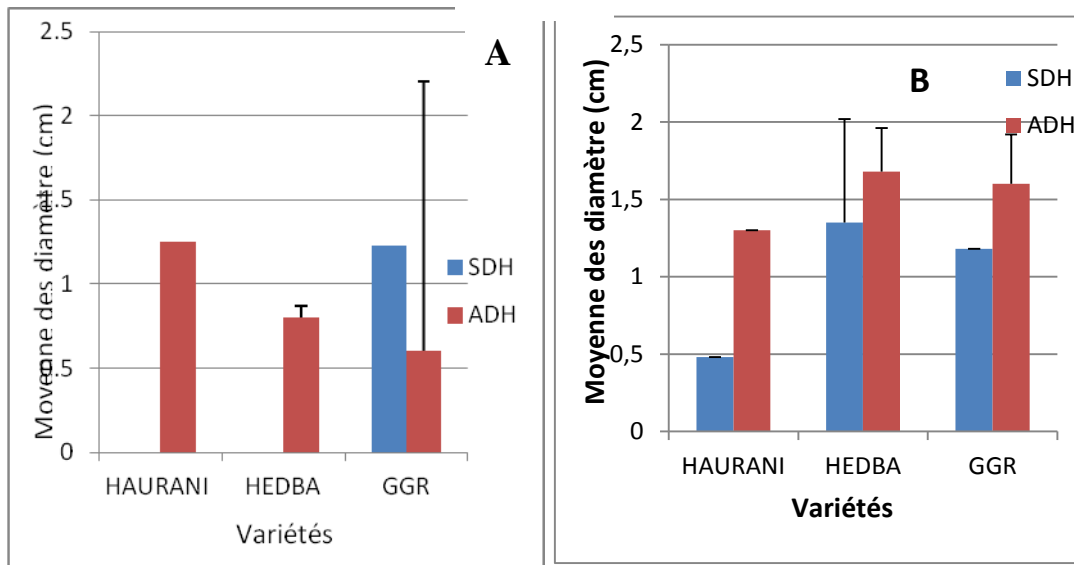
Le test SNK regroupe les variétés en seul groupe et même les deux traitements et les deux Bactéries.

GGR ≈ Hau ≈ Hed ↔ 0,704 ≈ 0,725 ≈ 1,113

SDH ≈ ADH ↔ 0,750 ≈ 0,944

E-coli ≈ Bacillus ↔ 0,819 ≈ 0,875

Puits



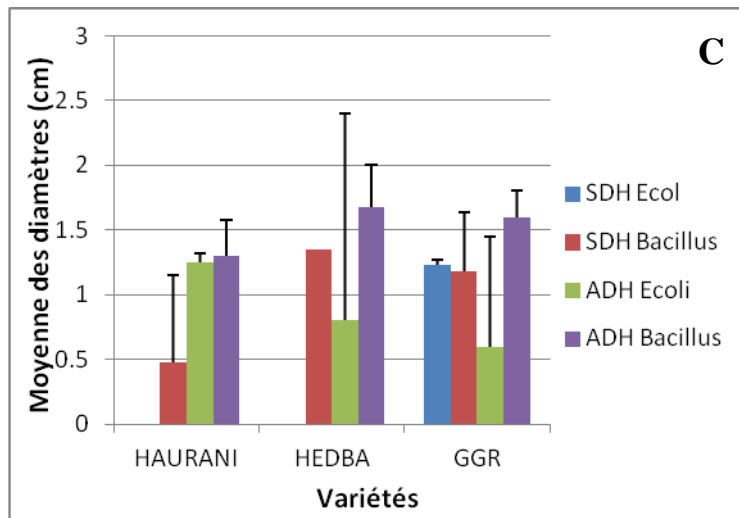


Figure 34 : Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase D'éthyle Acétate; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

Les extraits Hau et Hed ont aucune effet contre le développement et la croissance des *E. coli* au traitement SDH suivi par l' extrait GGR avec une moyenne de diamètre des zones d'inhibition de 1.23 ± 0.04 mm, au traitement SDH. Par contre au traitement ADH les extraits méthanoliques des variétés Hed et GGR ont un faible effet avec des moyenne de diamètre des zones d'inhibition de 0.8 ± 1.6 mm et 0.6 ± 0.85 mm successivement par rapport à Hau 1.25 ± 0.07 mm. (Figure 34A).

L'analyse statistique ne révèle aucun différence entre l'effet des extraits des trois variétés sur la bactérie *E-coli* (Figure 34 A) pour la technique des puits et également sur les deux traitements (Figure 34).

le test SNK regroupe les vriétés en seul groupe et aussi les deux traitements

$$\mathbf{Hau \approx Hed \approx GGR \leftrightarrow 0,400 \approx 0,625 \approx 0,913}$$

$$\mathbf{SDH \approx ADH \leftrightarrow 0,408 \approx 0,883}$$

L'extrait Hed a l'activité la plus forte contre le développement et la croissance des *Bacillus* au traitement SDH avec une moyenne de diamètre des zones d'inhibition de 1.38 ± 0 mm suivi par l'extrait GGR avec une moyenne de 1.18 ± 0.46 mm, et en dernier celui de Hau avec un effet plus faible que les extraits des deux autres variétés 0.48 ± 0.67 mm. Par contre au traitement ADH, les extraits méthanoliques des variétés Hau et GGR ont un faible effet avec des moyennes de diamètre des zones d'inhibition de 1.3 ± 0.28 mm et 1.6 ± 0.21 mm successivement, par rapport à Hed 1.68 ± 0.32 mm. (Figure 34 B).

L'étude statistique ne montre aucune différence entre l'effet des extraits méthanoliques des trois variétés étudiées de la phase Acétate d'éthyle sur la bactérie *Bacillus*. (Figure 34 B). Par contre, on remarque une différence entre les deux traitements. Les extraits ADH répondent mieux que les extraits SDH. Le test SNK enregistre le même groupe pour les trois variétés et deux groupes différents pour les deux traitements SDH et ADH.

Hed \approx GGR \approx Hau \leftrightarrow 0,888 \approx 1,388 \approx 1,525

SDH < ADH \leftrightarrow 1,000 < 1,525

Comparaison entre les deux bactéries

L'étude statistique anova à trois facteurs montre aucune différence entre l'effet des extraits des trois variétés mais enregistre une différence significative entre l'effet des deux traitements et les deux bactéries. (Figure 34c).

Selon le test SNK les trois facteurs sont classés en groupes: les variétés ont le même groupe. Alors que les traitements et les bactéries présentent deux groupes différents dont les extraits ADH exerce un effet activité plus forte que les extraits SDH. Aussi *Bacillus* a un effet plus rigoureux qu' *E. coli*.

Hau \approx Hed \approx GGR \leftrightarrow 0,756 \approx 0,956 \approx 1,150

SDH < ADH \leftrightarrow 0,704 < 1,204

E-coli < Bacillus \leftrightarrow 0,646 < 1,263

III.1.2. Phase Ether diéthylique Disque

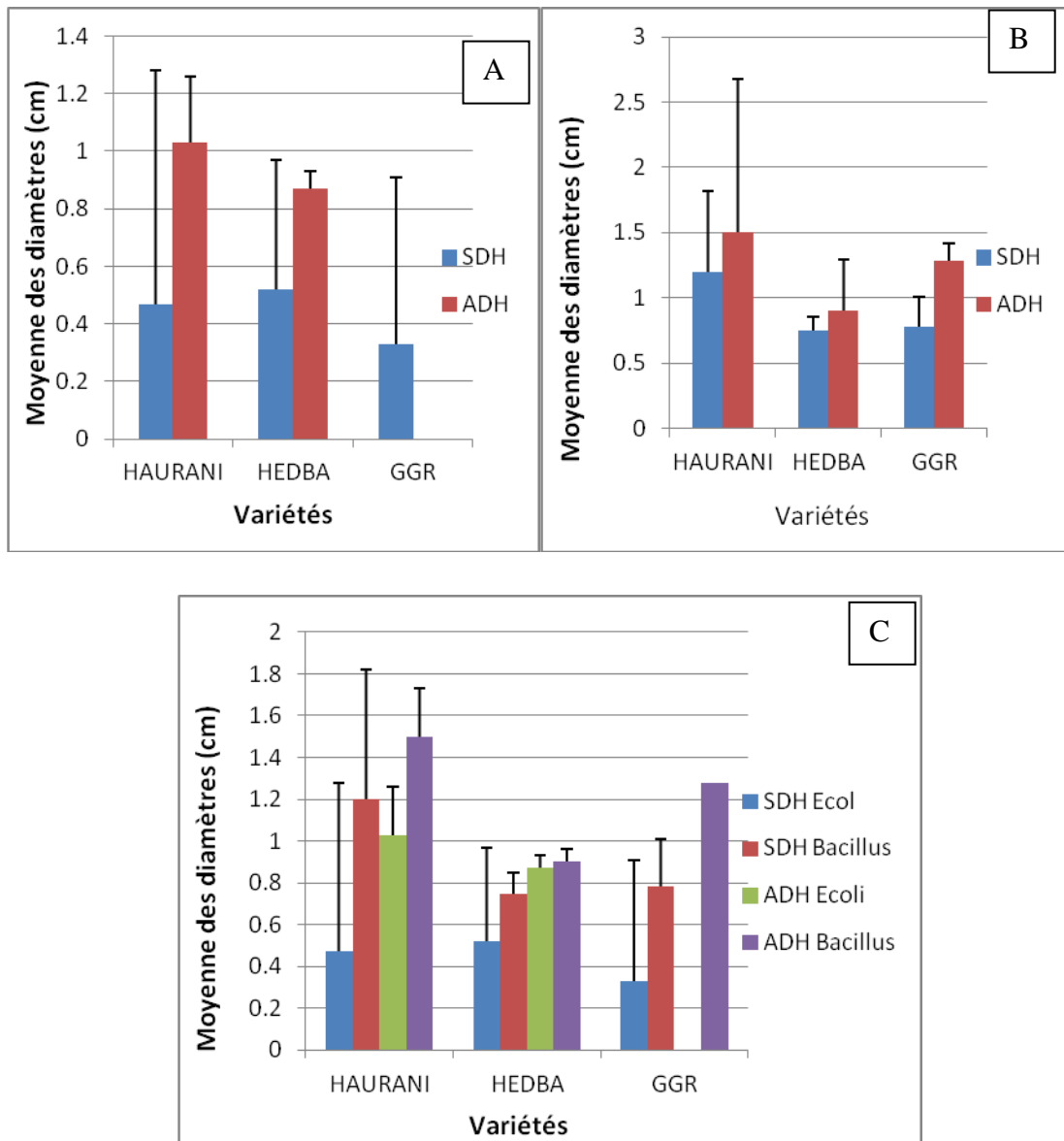


Figure 35 : Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Phase Ether diethylique; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

A : E.coli : $GGR \leq Hau \leq Hed$ $0,167 \leq 0,692 \leq 0,890$

SDH \approx ADH \leftrightarrow 0,532 0,633

B : Bacillus : $Hau \approx GGR \approx Hed$ \leftrightarrow 0,825 \approx 1,033 \approx 1,198

$$\text{SDH} < \text{ADH} \leftrightarrow 0,810 < 1,198$$

Comparaison entre les deux bactéries

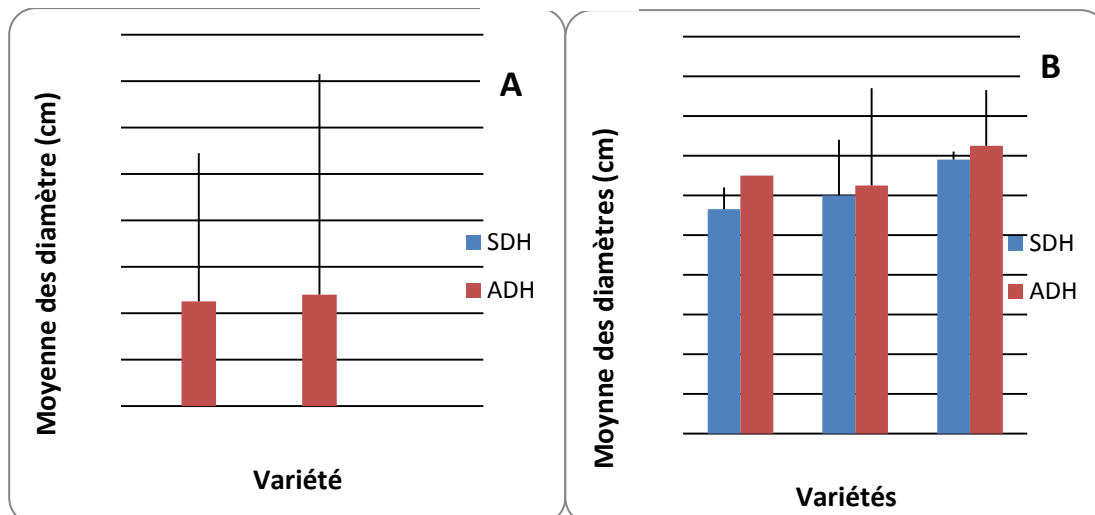
Aucun différence entre l'effet des extraits des trois variétés et les deux phases mais enregistre une différence entre les deux bactéries. (Figure 35 C).

$$\text{GGR} \approx \text{Hed} \approx \text{Hau} \leftrightarrow 0,706 \approx 0,727 \approx 0,731$$

$$\text{SDH} \approx \text{ADH} \leftrightarrow 0,622 \approx 0,821$$

$$\text{E-coli} < \text{Bacillus} \leftrightarrow 0,160 < 1,283$$

Puits



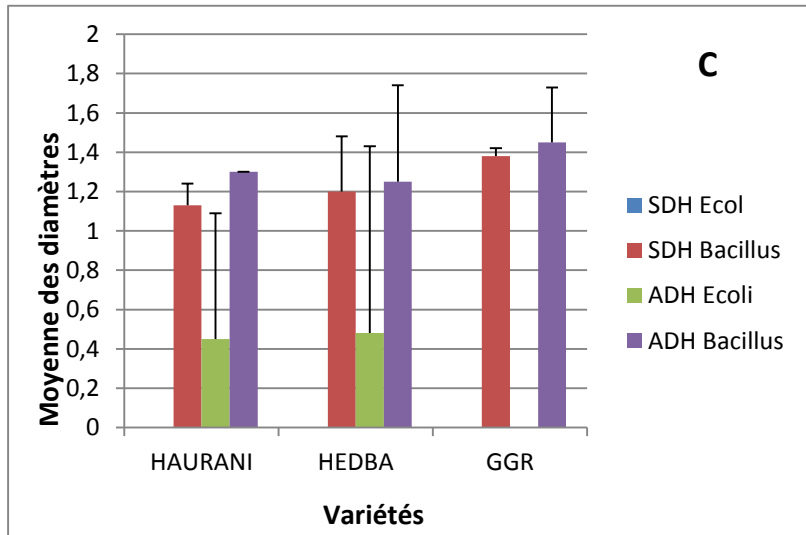


Figure 36: Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Ether diéthylique; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

A : E.coli GGR ≈ Hau ≈ Hed ↔ 0 ≈ 0,238 ≈ 0.252

SDH ≈ ADH ↔ 0.018 ≈ 0.308

B : Bacillus Hau ≈ Hed ≈ GGR ↔ 1.198 ≈ 1.225 ≈ 1.413

SDH ≈ ADH ↔ 1.224 ≈ 1.333

Comparaison entre les deux bactéries

GGR ≈ Hau ≈ Hed ↔ 0.706 ≈ 0.727 ≈ 0.731

SDH ≈ ADH ↔ 0.622 ≈ 0.821

E-COLI < BAILLUS ↔ 0.160 < 1.283

III.1.3. Phase Butanone

Disque

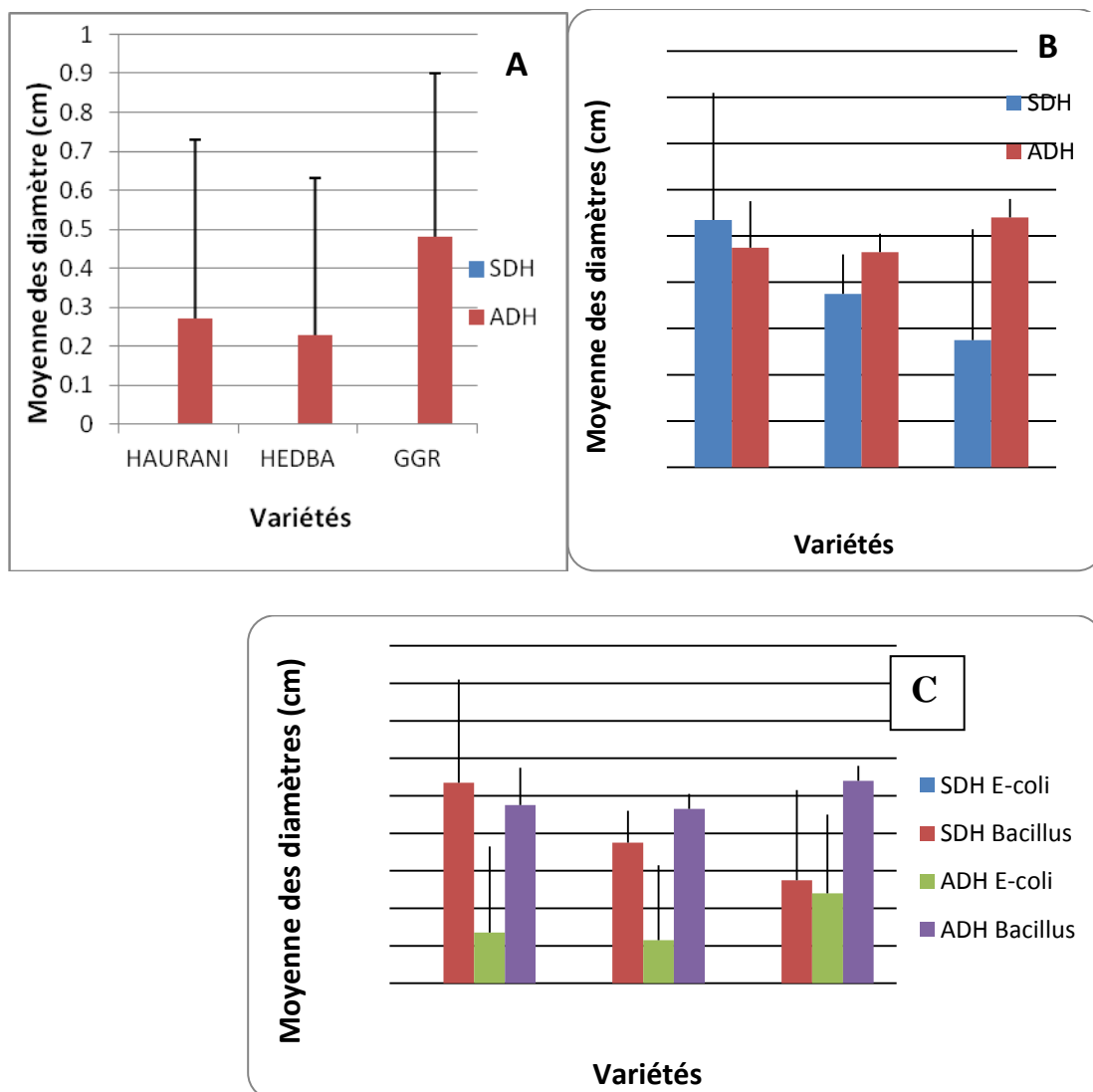


Figure 37 : Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Butanone; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

Les extraits méthanoliques de la phase Butanone des trois variétés au traitement SDH ne présente aucun effet inhibiteur avec E-coli.

A : E.coli Hed \approx Hau \approx GGR \leftrightarrow 0.117 0.127 0.242

SDH < ADH \leftrightarrow -0.004 < 0.328

B : Bacillus GGR \approx Hed \approx Hau \leftrightarrow 0.817 \approx 0.842 \approx 1.053

SDH \approx ADH \leftrightarrow 0.819 \approx 0.989

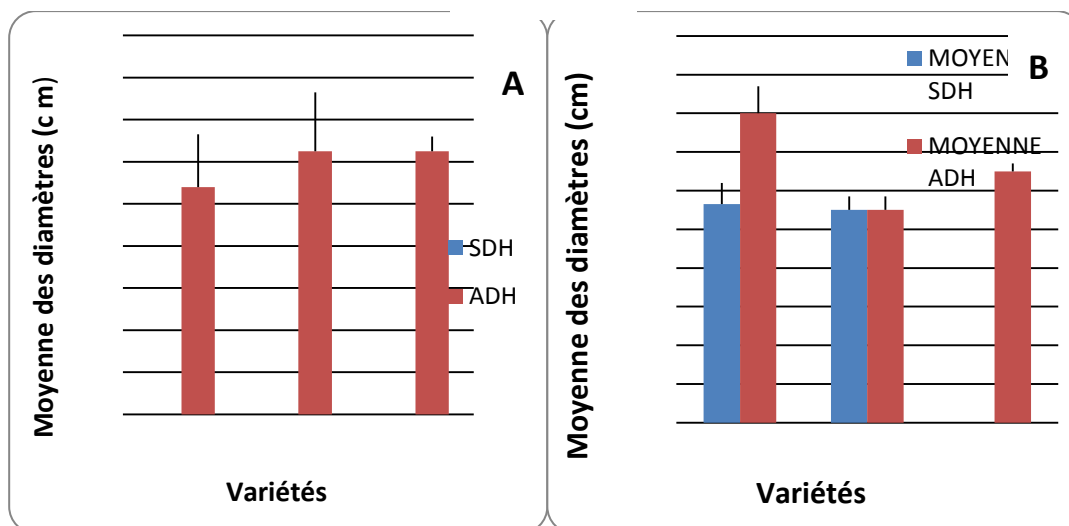
Comparaison entre les deux bactéries

$Hed \approx GGR \approx Hau \leftrightarrow 0.479 \approx 0.535 \approx 0.578$

$SDH < ADH \leftrightarrow 0.399 < 0.662$

$E. Coli < Bacillus \leftrightarrow 0.169 < 0.893$

Puits



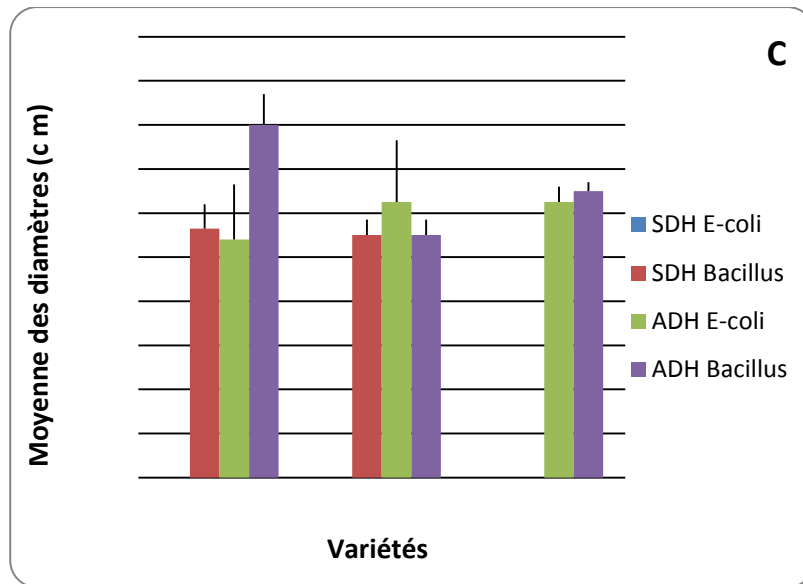


Figure 38 : Zones d’inhibition de développement des puits des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase Butanone; A: *E.coli* B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

Aucun effet que les extraits du trois variétés au traitement SDH.

A : E.coli Hau ≈ Hed ≈ GGR ↔ 0.516 ≈ 0.625 ≈ 0.625

SDH < ADH ↔ -0.015 < 1.192)

B : Bacillus GGR ≈ Hed ≈ Hau ↔ 0.663 ≈ 1.100 ≈ 1.311

SDH < ADH ↔ 0.707 < 1.342

Comparaison entre les deux bactéries

GGR ≈ Hed ≈ Hau ↔ 0.644 ≈ 0.863 ≈ 0.994

SDH < ADH ↔ 0.400 < 1.0267

E. coli < *Bacillus* ↔ 0.625 < 1.042

III.1.4. Phase aqueuse

Disque

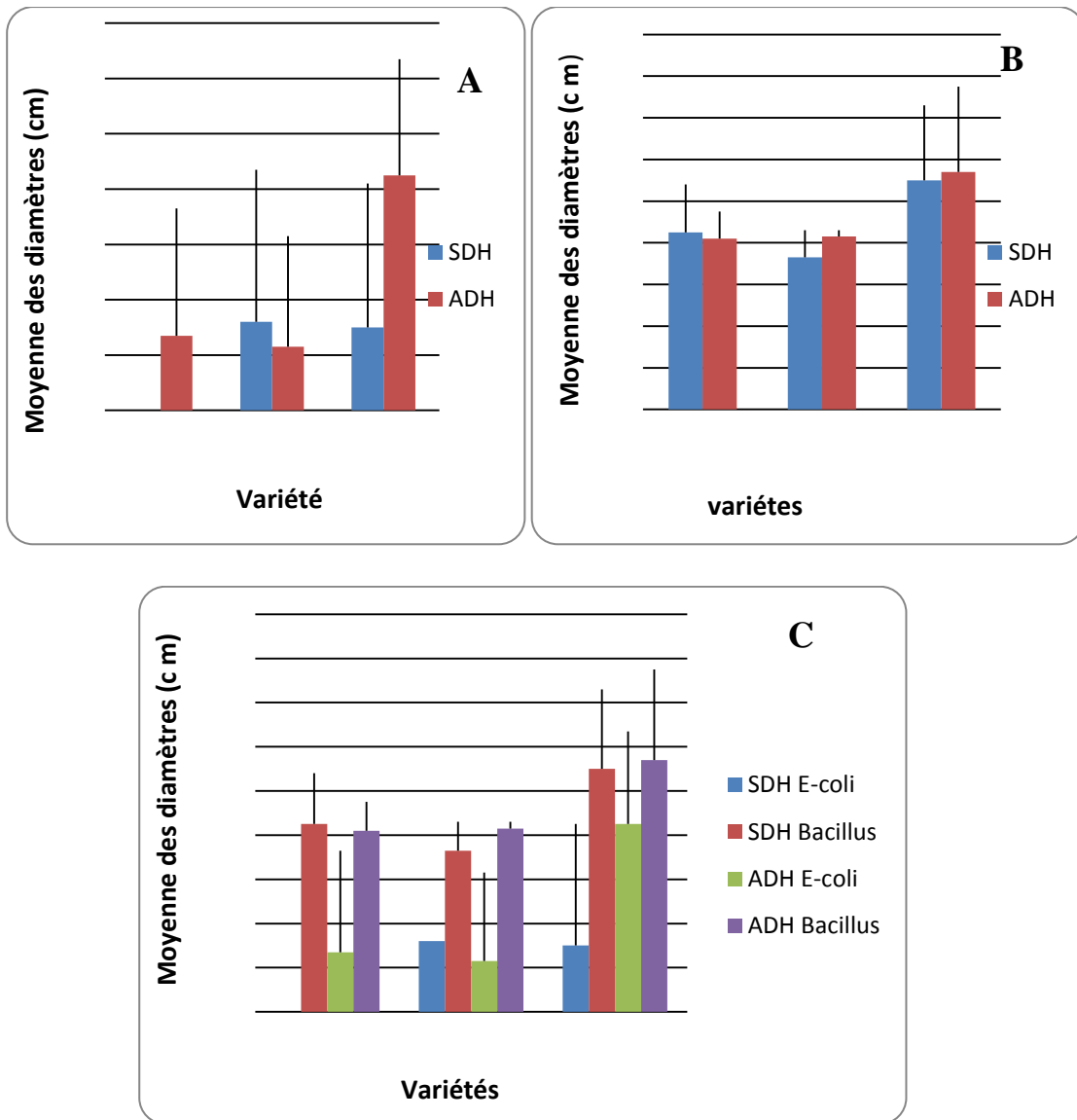


Figure 39 : Zones d'inhibition de développement des disques des deux bactéries *E.coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase aqueuse; A: *E.coli*
 B: *Bacillus* C: *E.coli* et *Bacillus*

A : E.coli Hau ≈ Hed ≈ GGR ↔ 0.136 ≈ 0.275 ≈ 0.575

SDH ≈ ADH ↔ 0.207 ≈ 0.450

B : Bacillus Hed ≈ Hau ≈ GGR ↔ 0.783 ≈ 0.880 ≈ 1.120

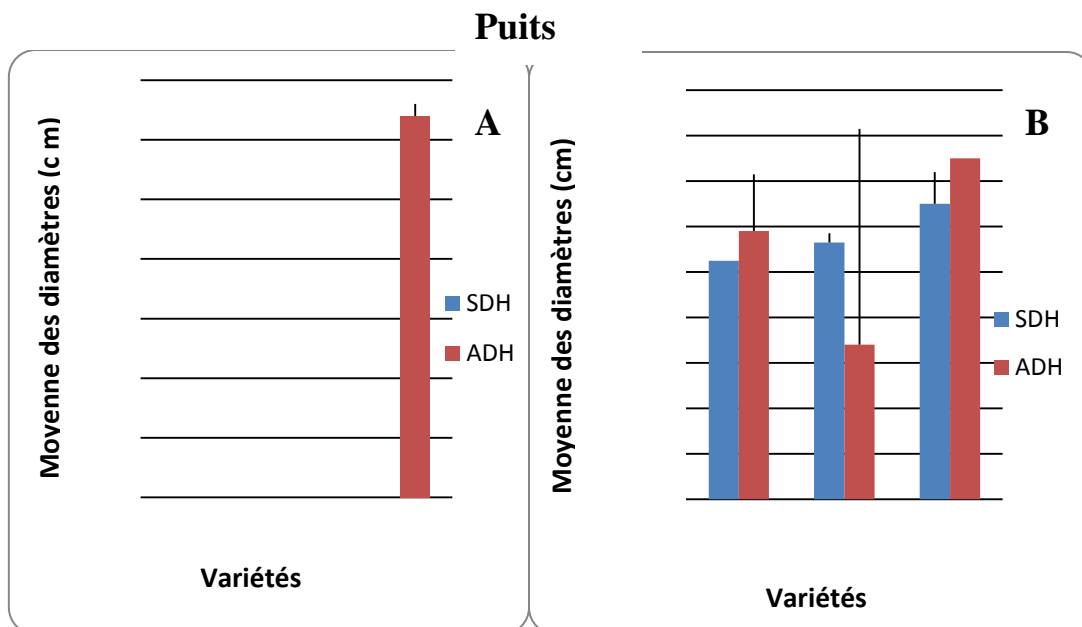
SDH ≈ ADH ↔ 0.925 ≈ 0.930

Comparaison entre les deux bactéries

Hau \approx Hed \approx GGR \leftrightarrow 0.496 \approx 0.529 \approx 0.837

SDH \approx ADH \leftrightarrow 0.558 \approx 0.683

***E.coli* \langle *Bacillus* \leftrightarrow 0.336 \langle 0.905**



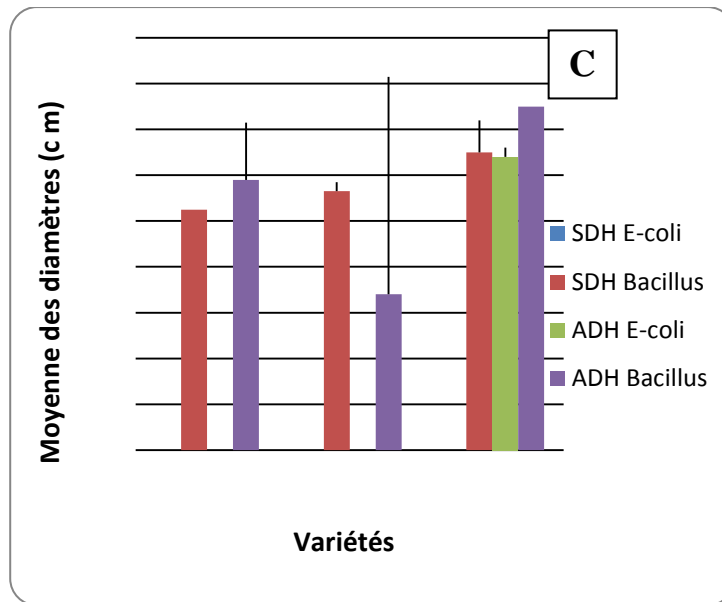


Figure 40 : Zones d'inhibition de développement des puits des deux bactéries *E. coli* et *Bacillus* aux traitements SDH et ADH par les extraits des trois variétés du blé dur de la phase aqueuse; A: *E. coli*
B: *Bacillus* C: *E. coli* et *Bacillus*

Les extraits Hau et Hed ne montre aucune effet au traitement SDH avec *E. coli*.

A : *E. coli* Hau \approx Hed \approx GGR \leftrightarrow -0.080 \approx 0.000 \approx 0.638

SDH \approx ADH \leftrightarrow -0.053 \approx 0.425

B : *Bacillus* Hed \approx Hau \approx GGR \leftrightarrow 0.900 \approx 1.144 \approx 1.400

SDH \approx ADH \leftrightarrow 1.179 \approx 1.117

Comparaison entre les deux bactéries

Hed \approx Hau <GGR \leftrightarrow 0.346 \approx 0.567 < 1.019

SDH \approx ADH \leftrightarrow 0.586 \approx 0.702

***E. coli* < *Bacillus* \leftrightarrow 0.220 < 1.068**

III. 2 Activité antifongique

L'effet des extraits phénoliques de deux traitements des trois variétés de blé dur est négatif sur la croissance de champignons *Fusarium sp.*

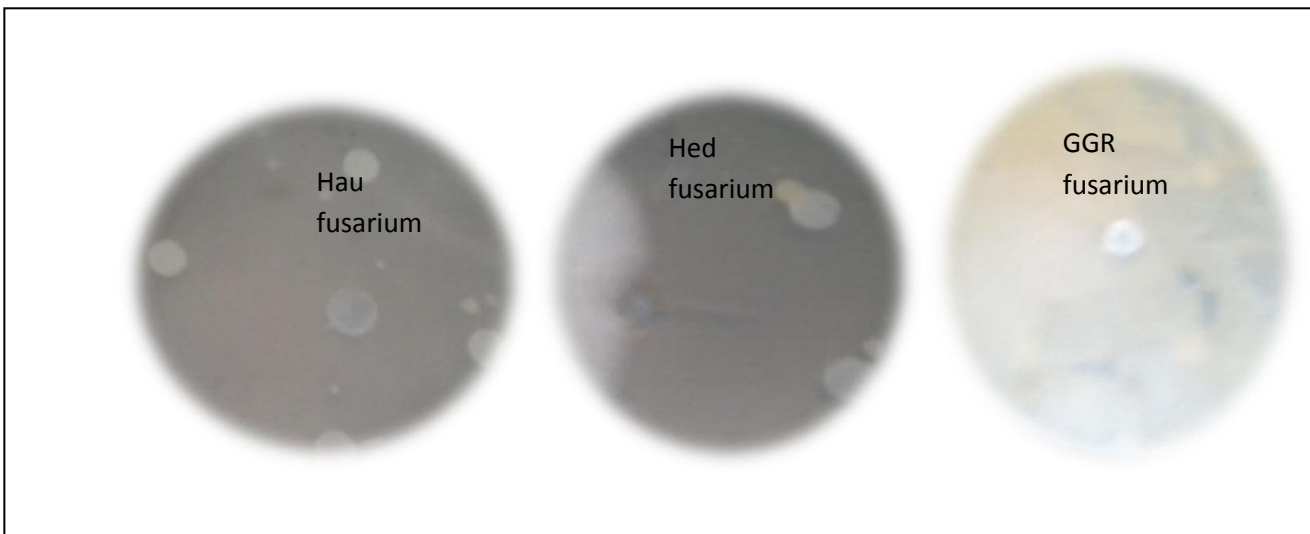


Figure 41 : Résultats de l'activité antifongique

conclusion

Les polyphénols sont des substances synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. Cette étude sert à comparer la teneur en polyphénols totaux des extraits des trois variétés du blé dur au traitement sans déficit hydrique (SDH) et avec déficit hydrique (ADH).

L'étude quantitative ou le dosage des polyphénols totaux indique que chacune variété a une teneur considérable en polyphénols. D'après l'analyse statistique cette teneur signifie une différence significative entre les trois variétés étudiées. Mais, elle ne reflète aucune différence significative statistiquement entre les deux traitements SDH et ADH, et elle varie entre 29.529 mg/g eq AG et 34.075 mg/g eq AG.

Après la séparation des polyphénols par une série d'affrontement des extraits éthanoliques, l'analyse des phases par un spectrophotomètre UV –Visible entre 220 et 400 nm montre que les extraits des variétés sont riches en phénols simples, acides phénoliques et flavonoïdes.

Les couleurs des phases sont clairement différentes qui aident à conclure que chaque phase contient quelques composés phénoliques.

Les solutions méthanoliques de la phase acétate révèlent quatre pics pour la totalité des solutions flavoniques situés à l'intervalle 222-397 nm. Les spots donnent des pics plus distincts qui sont fortement proches à ceux de la phase butanone.

La chromatographie sur couche mince illustre que les flavones et flavonols sont les flavonoïdes les plus dominants dans cette espèce.

Le nombre des spots des quatre phases d'affrontements du traitement SDH est le même que le traitement ADH. Le nombre des composés est presque le même avec une différence d'identification entre SDH et ADH.

Les phases Ether Diéthylique ont montré un seul spot coloré, ce qui indique qu'elles sont riches des acides phénoliques et phénol simple aux deux traitements SDH et ADH.

Les phases acétate D'éthyle ont montré pour la majorité deux spots. Par contre, la phase Butanone enregistre trois spots dans le traitement SDH et un seul spot dans le traitement ADH.

Les phases aqueuses sont riches en flavonoïdes et ont montré pour la totalité des variétés trois à quatre spots pour les deux traitements SDH et ADH respectivement.

Quatre groupes des composés phénoliques se distinguent au traitement ADH (1, 5, 6 et 8). Mais, seulement trois groupes au traitement SDH (3, 5 et 6)

On conclut que les deux traitements SDH et ADH contiennent principalement des flavonols et flavones avec des différentes substitutions. Par contre Les phases du SDH sont caractérisées par la présence des chalcones, flavanones et isoflavones qui sont exclusivement présent dans la phase acétate d'éthyle du SDH.

Les tests de l'activité antimicrobienne, plus précisément l'activité antibactérienne et antifongique sont réalisés par deux techniques (disques et puits)

Les résultats obtenus montrent que les extraits des trois variétés ont le même effet inhibiteur soit pour les disques ou pour les puits aux deux traitements SDH et ADH. Par contre les extraits ADH ont plus de réponse inhibitrice que les extraits SDH. La bactérie, *Bacillus* exerce un effet plus rigoureux que *E.coli* envers les extraits. Le champignon *Fusarium* est résistant envers les extraits des trois variétés aux deux traitements SDH et ADH. Il présente un résultat négatif.

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude quantitative et qualitative des polyphénols aux deux traitements sans déficit hydrique (SDH) et avec déficit hydrique (ADH) chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum Desf.*) : Haurani, Hedba et Guemgoum Rkham.

Les résultats obtenus de l'étude quantitative des extraits éthanoliques montrent que la teneur en polyphénols est considérable, chez les trois variétés aux deux traitements. L'étude qualitative des polyphénols commence par des répartitions entre quatre solvants de polarités différentes. Cela a conduit à l'obtention de différentes phases. Leurs compositions sont identifiées par le spectrophotomètre UV-Visible et la chromatographie sur couche mince. Les résultats obtenus distinguent quatre groupes des composés phénoliques se distinguant au traitement ADH (1, 5, 6 et 8). Mais, seulement trois groupes au traitement SDH (3, 5 et 6). Ce qui montre que la majorité des polyphénols détectés sont les phénols simple, les acides phénoliques et principalement des flavonoïdes de type flavone et flavonol.

Le test de l'activité antimicrobienne dévoile que les extraits méthanoliques exercent une forte activité antibactérienne surtout la bactérie *Bacillus* au traitement ADH. Alors que chez les champignons aucune résistance n'est développée contre *Fusarium*.

Mots clés : blé dur (*Triticum durum Desf.*) polyphénols, déficit hydrique, spectrophotomètre UV –Visible, antimicrobienne, chromatographie sur couche mince

المخلص

لقد ركز بحثنا الدراسة الكمية و النوعية للمركبات الفينولية تحت الاجهاد المائي و مقارنتها مع الحالة العادية عند 3 اصناف من القمح الصلب (*Triticum durum Desf.*) (حوراني. هدية. قمقم الرخام). الجزء الاول تم دراسة كمية و نوعية المركبات الفينولية خلال المرحلتين العادية و الاجهاد . الجزء الثاني اختبار نشاطه المضاد للمكروبات (البكتيري *Escherichia coli* و *Bacillus fusarium*).

تشير نتائج الدراسة الكمية الى وجود كميات مختلفة من المركبات الفينولية بين الاصناف بينما لا يوجد أي اختلاف بين المرحلتين . تمت معالجة المستخلصات الميثانولية بأربعة محاليل متفاوتة القطبية كل منهما متخصص في استخلاص قسم معين من المركبات الفينولية . حللت نتائج الدراسة النوعية للعينات الناتجة عن طريق قياس امتصاص الضوء في المجال المرئي و الفوق بنفسجي و تقنية الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة . دلت النتائج عن وجود فينولات بسيطة احماض فينولية و كذا الفلافونويدات خاصة الفلافونولوفلافون . اظهرت المستخلصات الغنية بالمركبات الفينولية ان لها نشاطا عاليا ضد البكتيريا خاصة ضد *Bacillus* في حالة الاجهاد المائي. بينما ليس لها أي مقاومة ضد فطر *fusarium*

الكلمات المفتاحية

القمح الصلب (*Triticum durum Desf.*). المركبات الفينولية. المضاد للمكروبات. امتصاص الضوء

الفلافونويدات

Summary

Our work has focused on the quantitative and qualitative study of polyphenols both without water deficit treatments (SDH) and water deficit (ADH) in three varieties of durum wheat (*Triticum*

durum Desf.) :Haurani, Hedba and GuemgoumRkham.

The results of the quantitative analysis of ethanol extracts showed that the polyphenol content is considerable, in three varieties to two treatments. The qualitative study of polyphenols begins with allocations between four solvents with different polarities. This leads to the obtaining of different phases. Their compositions were identified by UV-Visible Spectrophotometer and TLC. The results distingentFourgroups of phenolic compounds are distinguished ADH treatment (1, 5, 6 and 8). However, only three treatment groups in SDH (3, 5 and 6). Which show that the majority of polyphenols detected are single phenols, phenolic acids and flavonoids mainly flavone and flavonol-type.

The antimicrobial activity test revealed that the methanol extracts have a strong antibacterial activity especially Bacillus treatment ADH. Whereas in fungi is no resistance against fusariumdéveloppée.

Keywords: wheat (*Triticum durum* Desf) polyphenols, water deficit, UV-Visible spectrophotometer, antimicrobial, TLC