

Etude préliminaire à l'obtention de la forme sexuée de *mycosphaerella* graminicola et à l'expression enzymatique de *septoria tritici* / P. Halama et C. Sayde. — Extrait de : *Annales de recherche scientifique*. — N° 3 (2001), pp. 107-117.

Bibliographie. Figures. Tableaux.

I. *Septoria tritici*. II. Champignons — Anatomie. III. Enzymes — Activation.

Sayde, C.

PER L1049 / FA125713P

# ÉTUDE PRÉLIMINAIRE À L'OBTENTION DE LA FORME SEXUÉE DE *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA* ET À L'EXPRESSION ENZYMATIQUE DE *SEPTORIA TRITICI*

P. HALAMA<sup>1</sup> et C. SAYDE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Catholique de Lille,  
Institut Supérieur d'Agriculture  
41 rue du port, 59046 Lille Cedex, France

<sup>2</sup> Université Saint-Esprit de Kaslik,  
Faculté des Sciences Agronomiques  
B.P.446 Jounieh, Liban

## RÉSUMÉ

*Dans le but d'étudier l'influence de la reproduction sexuée sur la pathogénicité de S. tritici, des expériences sont faites au laboratoire de Biotechnologie des microorganismes à l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lilles. Ces expériences ont pour but d'essayer de contrôler l'obtention et le développement de la forme sexuée M. graminicola et établir une méthodologie qui permet l'étude de l'expression enzymatique de la pathogénicité.*

*Pour l'obtention de la forme sexuée, deux types d'expérience sont réalisées. Dans la première expérience, la culture des spores de S. tritici est faite sur un milieu gélosé à base de paille sèche de blé. Ces cultures sont soumises à trois conditions de température (10, 14 et 24 °C) et deux conditions d'éclairage (obscurité totale et alternance obscurité/lumière proche UV). Dans la deuxième expérience, les spores de S. tritici sont pulvérisées sur du blé sain et exposées aux conditions naturelles.*

*Pour le dosage enzymatique, une série de cultures est faite sur différents milieux de culture liquide afin de choisir le meilleur pour l'expression des activités enzymatiques.*

*Par rapport aux résultats, les périthèces de M. graminicola sont observées au mois d'octobre sur les blés exposés aux conditions naturelles. Alors que le milieu gélosé à base de paille sèche de blé n'a permis que l'obtention des ébauches de fructification incapables de s'évoluer en périthèces.*

*Le milieu YPPc à base de yeast extract, peptone et paroi cellulaire de blé a donné les meilleurs résultats parmi les milieux testés. Ce milieu a permis l'expression de six activités enzymatiques parmi les huit activités testées.*

## INTRODUCTION

Les Septorioses sont des maladies des parties aériennes des plantes, dus à des champignons microscopiques. Parmi les céréales, le blé est la culture principalement touchée par ces maladies.

Les Septorioses du blé sont des maladies du feuillage le plus fréquent et les plus dommageables en France (Caron, 1988).

Les deux champignons responsables du "Glume blotch" et du "leaf blotch" du blé sont respectivement *Stagnospora nodorum* et *Septoria tritici*.

*Septoria leaf blotch* est caractérisée par une forme imparfaite à reproduction asexuée connue sous le nom de *Septoria tritici* et une forme parfaite à reproduction sexuée connue sous le nom de *Mycosphaerella graminicola* (Halama, 1996).

La forme asexuée, *S. tritici*, est responsable du développement de la maladie dans les cultures (Brown *et al.*, 1978). C'est sous cette forme que le pouvoir pathogène est nettement exprimé causant des dégâts sévères dans les cultures. Ces dégâts sont causés en grande partie par les enzymes secrétées par le champignon qui dégradent les parois cellulaires de la plante hôte afin d'y pénétrer et s'installer (Lehtinen, 1993).

La forme sexuée, *M. graminicola*, est la source des contaminations primaires permettant l'établissement de la maladie dans la culture. La reproduction sexuée permet d'éventuelles recombinaisons génétiques pouvant avoir des conséquences sur la variabilité du pouvoir pathogène (Chen et Mc Donald, 1996).

Depuis plusieurs années, *Septoria tritici* est devenu l'espèce dominante au détriment de *Stagnospora nodorum* (Chen et Mc Donald, 1996).

Cette augmentation du pouvoir pathogène n'est pas clairement définie, mais semble causée par des modifications au niveau des gènes pathogènes.

Le but de cette recherche est d'étudier l'effet de la reproduction sexuée sur l'augmentation du pouvoir pathogène de *S. tritici*. Mais Pour réaliser cette étude, deux étapes sont nécessaires: la contrôle de la reproduction sexuée au laboratoire et l'établissement d'un moyen qui permet l'expression de la pathogénécité afin d'étudier et de comparer son évolution avec la reproduction sexuée.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de *S. tritici* utilisées dans l'expérience sont IPO 323 (mat 1-1) et l'IPO 94269 (mat 1-2). Ces souches ont comme caractéristiques d'être sexuellement compatibles.

### **Pour l'essai de l'obtention de la forme sexuée *in vivo***

Les blés cultivés dans les microparcelles expérimentales sont pulvérisés à 3 trois reprises par une suspension de mélange de spores de IPO 323 et IPO 94269 (1000000 spores/ml). Après pulvérisation, les blés sont couverts durant 72 heures par un film plastique pour garder une humidité relative élevée. Après trois jours, les blés sont exposés aux conditions naturelles. Des observations visuelles sont faites chaque deux semaines pour détecter la présence de la maladie et suivre son évolution. Les observations microscopiques sont faites sur les fructifications noires pour détecter la présence des périthèces de *M. graminicola*

### **Pour l'essai de l'obtention de la forme sexuée *in vitro***

Une suspension de mélange de spores de IPO 323 et IPO 94269 (20000 spores/ ml) est pulvérisé sur un milieu de culture gélosé contenant de la paille sèche de blé dans des boîtes de pétri et cela sous conditions aseptiques. Les boîtes de pétri sont ensuite placées dans des incubateurs sous trois conditions de température différentes (10, 14 et 24 °C) et deux conditions d'éclairage (obscurité totale ou alternance lumière proche UV/obscurité).

Des observations visuelles hebdomadaires sont faites pour suivre la présence et noter le développement des quatre formes de développement de *S. tritici* observées aux conditions de laboratoire. Ces quatre formes de

développement sont les colonies lévuriformes, les colonies intermédiaires, les colonies mycéliennes et les fructification noires. Ces derniers sont encore prélevés et observés sous microscope pour détecter la présence de périthèces de *M. graminicola*.

### **Pour la recherche du milieu de la culture permettant l'expression enzymatique de *S. tritici***

Deux groupes de milieu de culture liquide sont testés. Le premier groupe a pour composition de base de milieu Lehtinen (Lehtinen, 1993). Il comporte les milieux suivants: Lehtinen-glucose, Lehtinen-paroi cellulaire et Lehtinen-paroi cellulaire + glucose. Le deuxième groupe est à base de yeast extract et peptones. Il comporte les milieux suivants: YPG (yeast, peptones et glucose), YPPc (yeast, peptones et paroi cellulaire de blé) et YPPc +G (yeast, peptones, paroi cellulaire et glucose).

Pour chaque milieu de culture, une série d'erlen meyer est préparée. Les erlens meyers sontensemencés par une suspension de spores IPO 94269 pour le milieu lehtinen et IPO 94269 ou IPO 323 pour le milieu à base de Yeast et peptone. Les prélèvements sont faits au jour 7 et au jour 14 et les solutions obtenues après filtration sont envoyées au dosage enzymatique. Le dosage enzymatique est fait soit au 3,5 DNS (pour chercher les activités de xynalase, cellulase, polygalacturonase et B-1,3- glucanase), soit au PNP (pour chercher les activités de B-glucosidase, B-galactosidase, B-xylosidase et arabinosidase).

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **Pour l'obtention de la forme sexuée *in vivo***

Les premiers symptômes de septeriose sont apparus 34 jours après la première inoculation, en effet, l'installation de film plastique a permis de garder une humidité relative élevée durant 72 heures, ce qui a entraîné une période d'incubation de 24 jours (tableau 1).

La période d'incubation est suivie par une période de latence qui conduit à une sporulation. Les premiers signes de picnidospores sont observés au 38ème jour donc 14 jours après l'apparition des premiers symptômes. En tenant compte que la température moyenne durant cette période de l'année était d'environ 20°C, ces résultats obtenus correspondent avec les travaux de King *et al.* (1983) qui a remarqué une période de latence de deux semaines pour une température de 20°C.

Après l'incubation et les périodes de latence, la maladie commence à se développer dans les cultures. il est observé que le développement de la maladie se fait comme ont décrit King *et al.* (1983) et Caron (1982), qui ont signalé un développement des septorioses de l'étage foliaire inférieur vers les étages supérieurs. La maladie établie dans les parcelles expérimentales, le pathogène peut ainsi passer à son stade parfait, le stade sexué (*Mycosphaerella graminicola*). Les premiers signes de la présence de la forme sexuée sont détectés le 13 Octobre.

**Tab. 1:** Symptômes de *S.tritici* observés sur les blés inoculées aux microparcelles experimentales:

Feuille	f 1	f 2	f 3	f 4	f 5
<b>Jours</b> (après 1ère inoculation)					
<b>0 (1ère inoculation)</b>	-	-	-	-	-
<b>7 (2ème inoculation)</b>	-	-	-	-	-
<b>14 (3ème inoculation)</b>	-	-	-	-	-
<b>24</b>	+	+	-	-	-
<b>38</b>	f.t.n.	++++	++++	++	+
<b>52</b>	f.t.n.	f.t.n.	++++	++++	+++
<b>66</b>	f.t.n.	f.t.n.	f.t.n.	f.t.n.	f.t.n.

- f. : Feuille  
 - : absence de symptôme de *Septoria tritici*  
 + : petite tâche jaune  
 ++ : tâche nécrotique couvrant 10% de la surface de la feuille  
 +++ : tâche nécrotique couvrant 30% de la surface de la feuille  
 ++++ : tâche nécrotique couvrant 60% de la surface de la feuille  
 +++++ : tâche nécrotique couvrant presque la totalité de la surface de la feuille  
 f.t.n. : feuille totalement nécrosée

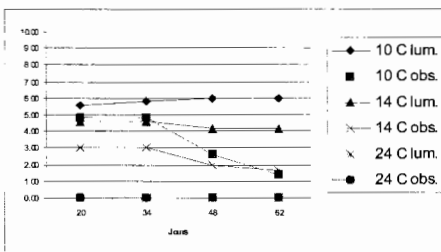
### Pour l'obtention de la forme sexuée *in vitro*

Les formes de développement de *S. tritici* agissent différemment avec les différentes conditions de températures et d'éclairage.

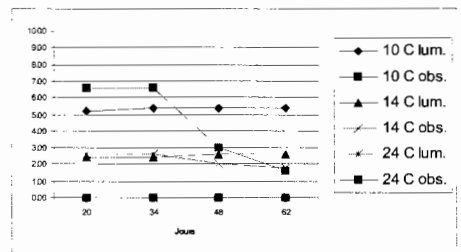
La présence de lumière aide les colonies levuriformes (fig. 1) et intermédiaires (fig. 2) à établir un développement rigoureux et stable suivant les températures. Les conditions d'obscurité continuelle favorisent le développement des fructifications (fig. 3) et des colonies mycéliennes (fig. 4).

Les températures de 10° et 14°C favorisent le développement des colonies levuriformes (fig. 1), intermédiaires (fig. 2) et des fructifications noires (fig. 3) avec un avantage léger pour la température de 10°C. La température de 24°C ne permet qu'aux colonies mycéliennes de se développer (fig. 4).

Pour les deux températures de 10 et 14°C, les résultats observés au 20ème jour semblent proches des résultats obtenus par Kema et Annone (1991) qui notent une dominance des colonies levuriformes de forme juvénile du développement à la température de 18°C. Par contre, à la température de 24°C, la seule forme de développement qui peut exister est du type colonies mycéliennes. Ces colonies sont la forme du vieillissement du développement qui se forme sur les milieux âgés (Djerbi et *al.*, 1972). En fait, l'augmentation de la température semble être stimulante au vieillissement des cultures et au développement des colonies mycéliennes, alors qu'elle agit négativement sur le développement des autres types de formations.



**Fig. 1:** Graphe montrant l'évolution du développement des colonies levuriformes avec le temps sous toutes les conditions d'incubation



**Fig. 2:** Graphe montrant l'évolution du développement des colonies intermédiaires avec le temps sous toutes les conditions d'incubation

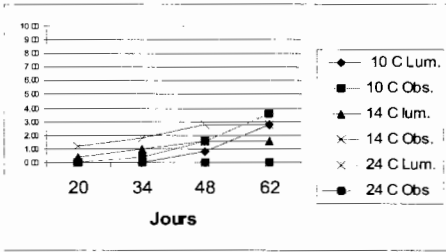


Fig. 3: Graphe montrant l'évolution du développement des fructifications noires avec le temps sous toutes les conditions d'incubation

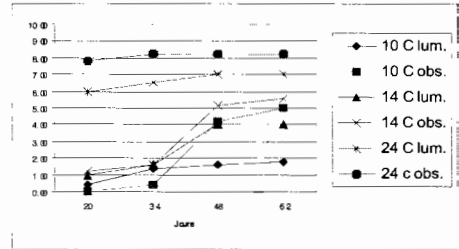


Fig. 4: Graphe montrant l'évolution du développement des colonies mycéliennes avec le temps sous toutes les conditions d'incubation

Le développement des fructifications noires (ébauches de fructification) semble être influencé positivement par l'obscurité continue. Ce résultat correspond avec les observations de Kema et Annone (1991) qui signalent que les cultures faites sous l'obscurité continue produisent une quantité plus grande de fructifications et celle de Pierobom (1983) qui note une légère augmentation de ce type de développement lorsque les cultures subissent certaines périodes d'obscurité.

Les fructifications noires restent des ébauches de fructification incapables de s'évoluer en périthèces de *M. graminicola*. De toute façon, *S. tritici* n'a jamais été observé sous sa forme sexuée dans un milieu de culture artificielle (Kema et Annone, 1991).

### Pour la recherche du milieu de culture permettant l'expression des activités enzymatique:

D'après le tableau 2, la seule activité enzymatique qui peut être mentionnée dans le groupe des milieux Lehtinen est la polygalacturonase, cette activité atteint sa valeur optimale dans le milieu Lehtinen-paroi cellulaire. Alors que dans le groupe à composition de base de yeast extract et peptones, il est observé que le nombre et les valeurs des activités enzymatiques détectées sont supérieures que celles du milieu Lehtinen soit en utilisant la souche IPO 94269 ou la souche IPO 323. Le nombre des activités enzymatiques maximal est trouvé dans le milieu YPPc où il est détecté les activités enzymatiques suivantes: xylanase, polygalacturonase, cellulase, B-glucosidase, b-xylosidase et B-1,3- glucanase. Ce résultat correspond avec des travaux faites sur *Septoria nodorum* et qui ont montré des activités enzymatiques supérieures dans les milieux contenant des parois cellulaires (Lehtinen, 1993).



**Tab. 2:** Activités enzymatiques au jour 7 et au jour 14 dans les milieux de base Lehtinen et les milieux de base yeast extract et peptone:

Type de milieu	Milieu à base de Lehtinen										Milieu à base de yeast extract et peptone										
	IPO 94269					IPO 94269					IPO 323					IPO 323					
	Jour 7		Jour 14			Jour 7		Jour 14			Jour 7		Jour 14			Jour 7		Jour 14			
Milieu	Gluc.	P.C.I	Gluc +P.C.	Gluc.	P.C.	Gluc+P.C.	YPG	YPPe	YPPe +G	YPPe	YPPe	YPPe +G	YPPe	YPPe	YPPe +G	YPPe	YPPe	YPPe +G	YPPe	YPPe	YPPe +G
<b>xylanase</b>	0*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,590*	16,14	6,99	0,00	19,09	7,41	0,525*	14,17	2,95	0,26	12,73	3,87			
<b>polygalacturonase</b>	13,05	17,71	14,89	17,58	36,34	36,80	0,00	0,00	0,00	37,29	24,53	39,36	0,00	2,17	5,18	43,29	22,56	0,66			
<b><math>\beta</math>-glucosidase</b>	0,00	0,00	0,00	5,33	3,67	0,00	16,67	97,67	26,00	32,50	339,00	56,33	7,00	77,67	28,33	21,00	62,67	47,67			
<b><math>\beta</math>-xylosidase</b>	0,00	4,03	0,00	0,00	0,00	0,00	2,66	12,32	8,70	0,00	85,27	26,57	27,05	32,61	25,60	0,00	156,28	0,00			
<b>cellulase</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	1,89	1,02	0,00	0,53	0,24	14,60	2,71	7,25	0,00	1,11	0,00			
<b><math>\beta</math>-1,3-glucanase</b>	0,00	0,24	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	2,12	0,43	0,00	0,00	1,25	0,00	1,92	0,00	0,00	0,96	0,00			
<b><math>\beta</math>-galactosidase</b>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,13	1,78			
<b><math>\alpha</math>-arabinosidase</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			

• les activités enzymatiques sont exprimées en mU/ml.

En effet, pour se développer, ce pathogène dégrade les composants des parois cellulaires de blé pour les utiliser comme source de carbone. Pour cela, il y a sécrétion de xylanase, xylosidase et glucosidase dans le but de dégrader la chaîne de xylane (composant essentiel de la paroi primaire des monocotylédones) et ses chaînes latérales composées essentiellement d'acide glucuroniques.

La polygalacturonase est produite pour dégrader les polysaccharides pectiques et les chaînes latérales composées essentiellement d'acide polygalacturoniques.

La glucanase et la cellulase dégradent le glucane et la cellulose. (Lehtinen, 1993).

En plus la présence du glucose affect négativement l'expression de quelques enzymes comme la xylosidase et la xylanase (Leathers *et al.*, 1986); (Lehtinen, 1993)

## CONCLUSION

De l'ensemble des résultats obtenus auparavant, des conclusions peuvent être tirées qui sont les suivantes:

- La forme sexuée (*Mycoshaerella graminicola*) fut obtenue à partir de suspension de spores de deux souches de *S.tritici* sexuellement compatibles pulvérisée sur des cultures de blés en microparcelles et exposés aux conditions naturelles.
- aucune trace de la forme sexuée n'est observée dans les milieux de cultures *in vitro* malgré l'obtention de formes de fructification.
- Le milieu YPPc a permis la meilleur expression des activités enzymatiques parmi les six milieux de culture testés.

**BIBLIOGRAPHIE**

- BROWN, J.S., KELLOCK A.W. and PADDICK R.G., 1978, Distribution and dissemination of *M. graminicola* (Fuckel) Schroeter in relation to the epidemiology of speckled leaf blotch of wheat, *Journal of Agriculture Research*, vol. 29, pp. 1139-1145
- CARON, D., 1988, Fiches maladie sur *Septoria tritici*. Perspectives agricoles no. 125, pp 26 – 32.
- CHEN R.S. and MC DONALD B.A., 1996, Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*, *Genetics*, vol 142, pp. 1119-1127
- DJERBI, M., 1972, Contribution à l'étude de la sporulation du *Septoria tritici* DESM; *Archives de l'institut Pasteur de Tunis*. 49, pp. 61-68
- HALAMA, P., 1991, *Phaeosphaeria nodorum* (Mull.) Hedj. (Ex *Leptosphaeria nodorum* Mull.) Teleomorphe de *Septoria nodorum* Berk. – Déterminisme et ontogénie – Hérité du pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat.
- KEMA G.H.J et ANNONE J.G., 1991, In vitro production of pycnidia by *Septoria tritici*, *Netherlands Journal of plant pathology*, vol 97, pp. 65-72
- KING L.G., COOK M.T. and MELVILLE F.L., 1983, A review of *Septoria* diseases of wheat and barley. *Ann. Appl. Biol*, 103, pp. 345-373
- LEATHERS T.D., DETROY R.W. and BOTHAST R.J., 1986, Induction and glucose repression of xylanase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnology letters*, vol 8 , no. 12, pp. 867-872.
- LEHTINEN U., 1993. Plant cell degrading enzymes of *Septoria nodorum*, *Physiological and Molecular plant pathology*, vol 43, pp 121-134
- PIEROBOM, C.R., 1983, Studies on pycnidial and ascocarpic fungi which cause leaf spots in wheat in Washington, Ph. D. Thesis , Washington state University, Pullman, Washington.

# IDENTIFICATION DES PRATIQUES CULTURALES DES CULTURES PROTÉGÉES DE LA COURGETTE ET DU HARICOT: ANALYSE DES RÉSIDUS DES PESTICIDES.

Dr.C. HILAN\* et  
N. EL KHARRAT\*

\*Université Saint Esprit Kaslik  
Faculté des Sciences Agronomiques

## RÉSUMÉ

*Dans le but d'identifier les pratiques culturales adoptées par les agriculteurs et de déterminer les traitements phytosanitaires appliqués, une enquête basée sur un questionnaire s'est avérée nécessaire dans la région où les cultures de courgette et haricot sont intensives. Elle a été menée dans 35 exploitations de courgette et 20 exploitations de haricot, réparties au Nord-Liban, en particulier dans le Casa El Menieh-Dounieh et son voisinage. Dans le but d'analyser les résidus des pesticides dans les courgettes et les haricots, des échantillons ont été collectés des 11 exploitations enquêtées. Ainsi un dosage des 10 matières actives a été effectué au laboratoire des pesticides à l'Institut de Recherches Agronomiques du Liban (Fanar).*

*L'enquête a montré que la variété de courgette la plus utilisée est Clarita (77.5%) et celle du haricot est Gina (51.5%). Pour les rotations appliquées, 46% des serristes cultivent le haricot pendant 3 mois, suivi de la courgette pendant 4 mois. Dans 44% des exploitations, la culture protégée du haricot est cultivée comme culture intercalaire avec d'autres cultures. De point de vue stérilisation, 85% des serristes fumigent leur sol chaque 2 à 3 ans. Pour la plantation, les graines de courgette et haricot sont semées en place dans 73% des exploitations. De plus, la plupart des horticulteurs ne suivent pas le calendrier de fertilisation. Les traitements phytosanitaires contre les maladies et les ravageurs des cultures sont très variés, car d'après les enquêtes une*

*gamme de plusieurs produits ont été signalés, et en quantité élevée : le méthamidophos et le pyrazophos (54%) dans les exploitations de courgette et l'abamectin (70%) dans celles du haricot.*

*Les résultats des dosages ont montré la présence du penconazole, du lambda-cyhalothrine et du fénarimol à des taux supérieurs ou proches aux limites maximales des résidus dans les échantillons crus de courgette. Les mêmes résultats sont pour ceux du haricot à l'exception du fénarimol se détectant nul. Pour la plupart des échantillons bouillis, ces doses se sont avérées faibles ou nulles.*

## **INTRODUCTION**

Les cultures protégées ont connu une expansion spectaculaire cette dernière décennie (Ward, 1995). Elles occupent une superficie totale de 1976ha (Ministère de l'agriculture, 1997) dont une zone considérable de 226ha et 120ha est occupée par la courgette et le haricot (Comptoir Agricole, 1997). En effet, les cultures protégées de courgette et haricot nécessitent, pour une production qualitative et quantitative, des exigences culturales spécifiques. Comme elles nécessitent, pour la lutte et la prévention des maladies et des ravageurs, des traitements phytosanitaires adéquats (Louvet, 1981).

Cependant, la lutte chimique reste un outil essentiel et en tout cas le plus performant dans la protection des plantes (ACTA, 2000). Mais, l'emploi aléatoire des produits chimiques provoque de graves problèmes chez l'homme et dans l'environnement (Baalbaki, 1991). Ainsi, les légumes et les fruits contaminés avec des quantités néfastes sont suspectés d'être cancérogènes, et d'être associés à des dérèglements du système nerveux et immunitaire (National Research Council, 1993). Cette étude consiste à étudier l'état sanitaire des cultures protégées de courgette et haricot en identifiant, d'une part, les pratiques culturales, et d'autre part, la quantité de résidus de pesticide dans les fruits.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Une enquête s'est avérée nécessaire au Nord-Liban à Casa El Menieh-Dounieh et son voisinage vue que les cultures protégées de courgette et haricot sont intensives. Basée sur un questionnaire, elle vise l'identification des exploitations, des variétés utilisées des pratiques culturales adoptées et des

traitements phytosanitaires appliqués. Cette enquête a été menée dans 35 exploitations de courgette et 20 exploitations de haricot, choisies selon leur nombre de serre. En parallèle, un échantillonnage est effectué dans le but d'analyser les résidus des pesticides. Ainsi, une collecte de 11 échantillons de courgette et de haricot a été réalisée des différentes exploitations enquêtées et durant la saison de production.

Les analyses des échantillons crus et bouillis ont lieu au laboratoire des pesticides à l'Institut des Recherches Agronomiques du Liban à Fanar. Pour le dosage des résidus de 10 matières actives, la méthode de l'American Association of Analytical Chemistry (AOAC méthode 970.52, 1995) est appliquée. Elle comporte plusieurs phases: la phase d'extraction qui consiste à homogénéiser la matière végétale (échantillon cru ou bouilli) avec de l'acétonitrile puis centrifuger l'extrait pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est soumis à une purification durant laquelle les résidus de pesticides sont collectés sur une colonne de Florisil. Cette phase est suivie par la phase d'élution qui se fait par passage de l'éther de pétrole et de l'éther diéthylique sur la colonne de Florisil. Ensuite, après évaporer le solvant, l'extrait obtenu est dilué avec de l'hexane, pour être enfin injecté dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse.

La quantification des résidus des pesticides est faite suivant une formule de l'AOAC ( $R \text{ (mg/kg)} = (H \cdot V \cdot C \cdot V_s \cdot D \cdot Tr) / (h \cdot Ve \cdot G)$ ).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1- Résultats et discussion de l'enquête

L'investigation montre que 48% des exploitations enquêtées de courgette se situent à Menieh et les autres exploitations à Dhour El Menieh, Mhamra, Bhanin, Chalbé et Rihanieh. Pour les exploitations de haricot, 25% des enquêtes sont effectuées à Menieh et 25% autres à Dhour El Menieh, le reste des enquêtes est réalisé à Mhamra, Bhanin, Chalbé et Rihanieh (Fig.1).

D'ailleurs, parmi les régions investiguées, celles de Menieh et Dhour El Menieh sont les plus productives de courgette (Ministère de l'Agriculture, 1997).

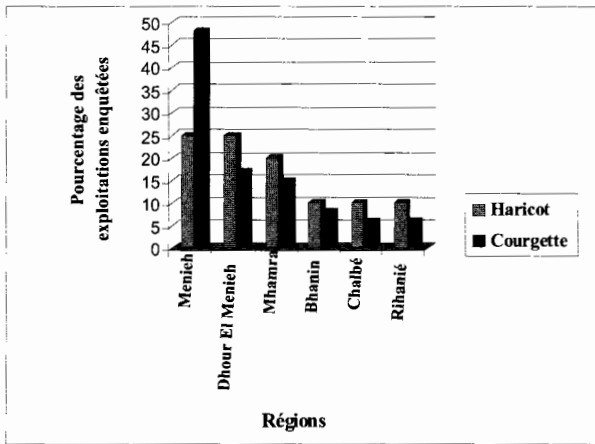


Fig 1: Distribution des exploitations enquêtées de courgette et haricot par région

Selon le sondage effectué, la variété Clarita est cultivée dans 77.5% des serres de courgette et les autres variétés sont cultivées dans un nombre moindre de serres. Pour les exploitations de haricot, la variété Gina est cultivée dans 51.5% des serres, et la variété Strike F1, les cultivars et diverses variétés sont cultivées à des taux inférieurs.

Ce grand choix des variétés Clarita et Gina est lié à leur rendement élevé, à leur précocité, à la couleur et à la texture de leurs fruits, rejoignant Ctifl (1992) dans ce choix.

L'investigation montre aussi que 46% des serristes cultivent le haricot pendant 3 mois suivi de la courgette pendant 5 mois et les autres agriculteurs appliquent des rotations diverses (Fig. 3).

En outre, 66% des horticulteurs cultivent le haricot comme culture essentielle et 34% autres cultivent le haricot comme culture intercalaire avec d'autres cultures comme le poivron, la tomate et la concombre (Fig. 4).

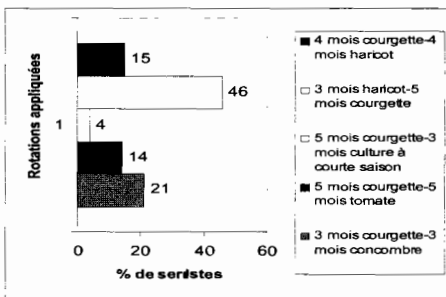


Fig 3: Rotations appliquées

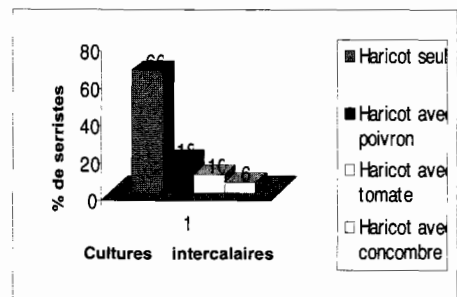


Fig 4: Cultures intercalaires



A propos de l'apport organique, 53% des serristes épandent 3 à 4 t/dn et 20% épandent 5 t/dn. Cet apport est parfois très élevé provoquant ainsi des problèmes de salinité du sol .

En ce qui concerne la fertilisation, l'ignorance des propriétés physiques et physico-chimiques du sol et des besoins de la plante pousse les agriculteurs à utiliser des fertilisants inadéquats. Ceci aboutit selon Wien (1997) à la pollution de la nappe phréatique et a des effets négatifs au niveau du métabolisme de la plante et de la qualité des fruits.

L'investigation montre aussi que les serristes estiment d'une manière subjective la dose et la fréquence d'irrigation. Cette dernière dépend de l'expérience des agriculteurs qui n'ont pas recours aux besoins en eau de la culture, à l'évapotranspiration et à l'humidité du sol.

Selon le sondage effectué, les maladies et les ravageurs sont presque communs dans toutes les exploitations enquêtées de courgette et haricot.

Parmi les ennemis de courgette, citons les plus importants: la pourriture grise apparaissant dans 61% des exploitations et l'oïdium dans 58% des exploitations. Les ravageurs les plus répandus sont les tétraniques tisserands dans 42% des exploitations et les mineuses dans 30%.

Parmi les maladies de haricot citées par les serristes, les fontes de semis dans 61% des exploitations, suivies de l'oïdium 34%. Parmi les ravageurs de haricot, les acariens attaquent 74% des exploitations, suivis des pucerons attaquant 48% des exploitations et la mouche des semis dans 22% des exploitations.

Pour sauver leurs cultures, les serristes ont recours à des luttes chimiques irrationnelles de point de vue fréquence, dose et choix de la matière active. Ce qui conduit selon Baalbaki (1991) à l'accumulation des résidus de pesticides, à l'augmentation du coût de la production et surtout à la pollution de la biosphère.

Pour les exploitations de courgette, l'enquête montre que les agriculteurs pulvérisent une gamme de 20 pesticides. En effet, le méthamidophos et le pyrazophos sont les plus utilisés par les serristes (54%) de courgette, le reste des matières actives est pulvérisé par un nombre moindre.

Par contre, les agriculteurs de haricot pulvérisent une gamme de 15 pesticides dont l'abamectin est utilisé par 70% des serristes, et le méthomyl est utilisé par 45% des serristes. Le reste des matières actives représentent des pourcentages inférieurs.

## 2-Résultats et discussion des dosages des résidus des pesticides

Les analyses des échantillons crus de courgette ont montré que le Lambda-Cyhalothrine (fig.a), le Penconazole (fig.b) et le Fénarimol (Fig.c) sont détectés parfois à des doses supérieures ou proches des limites maximales de résidus. Le Folpet, l'Iprodion, le Procymidon, le Cyperméthrine, le Diméthoate, l'Endosulfan, et le Métalaxyl sont détectés dans la plupart des échantillons à des taux inférieurs à la limite maximale des résidus.

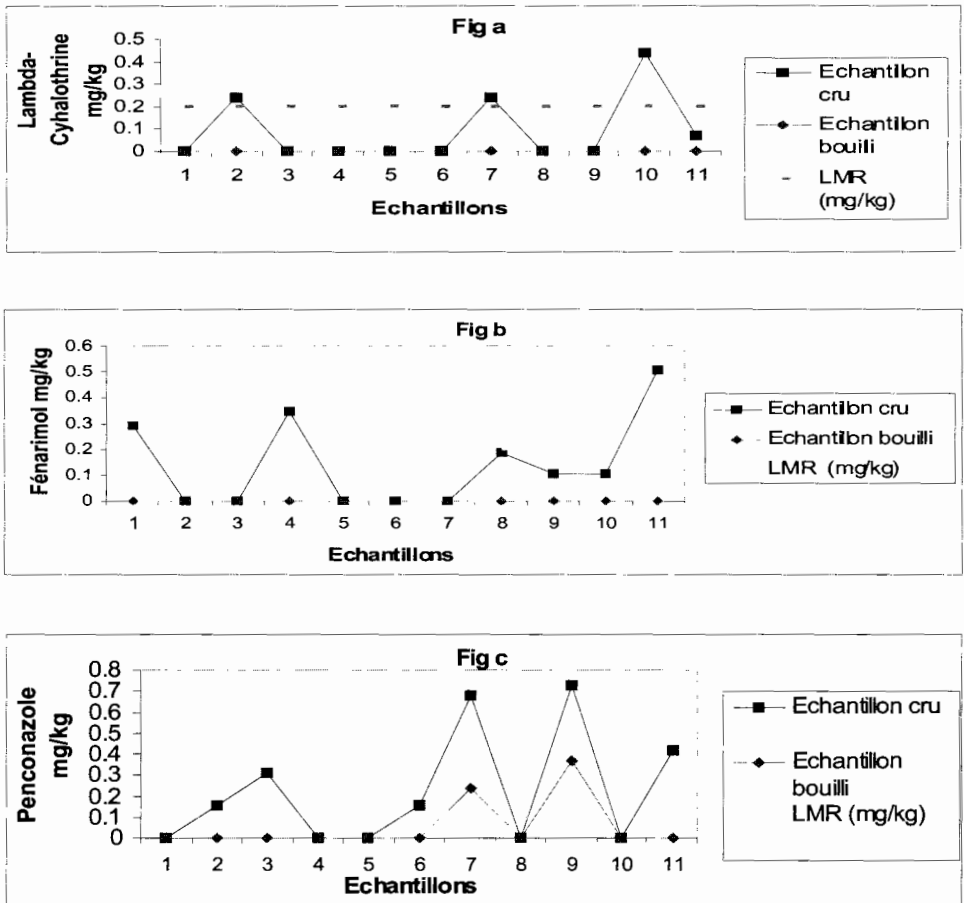
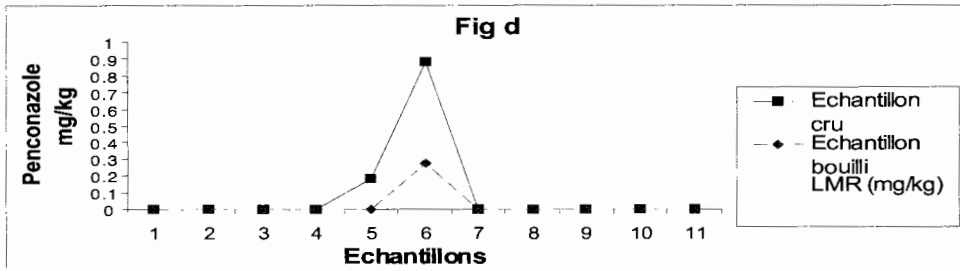


Fig 2: Les doses (mg/kg) du Lambda-cyhalothrine (fig.a), du Fénarimol (fig.b) et du Penconazole (fig.c) dans les échantillons de courgette crus et bouillis par rapport à la LMR.

Dans les échantillons crus de haricot, seul le Penconazole (fig. d) a été détecté à des doses supérieures ou proches des limites maximales de résidus. Les 9 matières actives qui restent, sont détectées, dans la plupart des échantillons, à des taux inférieurs à la limite maximale de résidus.



**Fig d :** Les doses (mg/kg) du Penconazole dans les échantillons de haricot crus et bouillis, par rapport à la LMR.

Les taux élevés des résidus, détectés dans les échantillons crus de courgette et haricot, sont dus à une surapplication des matières actives pendant la période de pré-récolte ce qui s'accorde avec les explications de Baalbaki (1991). En revanche, ces taux se sont avérés faibles ou nuls dans les échantillons bouillis. Ce qui conforme les explications de Hassall (1990) dans la dégradation des pesticides en leur métabolites non identifiés.

## CONCLUSION

Certains serristes adoptent une irrigation statique, un apport organique et inorganique aléatoire et des luttés chimiques hasardeuses, entraînant ainsi une mauvaise utilisation de l'eau, des effets négatifs sur la plante et d'accumulation des résidus des pesticides dépassant les LMR. Ce qui confirme donc l'hypothèse de la mauvaise gestion des serres de courgette et haricot.

Il est recommandé aux serristes de suivre des séances de formation technique sur les pratiques culturales optimales et d'avoir recours aux laboratoires spécialisés pour effectuer des analyses du sol, des eaux d'irrigation et des fruits obtenus.

## RÉFÉRENCES

- ACTA, 2000. Index Phytosanitaire, 36<sup>ème</sup> éd., 644 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., Vol. I, Method 970.52.
- BAALBAKI, A., 1991. Étude sur les cultures protégées au Liban. Ministère de L'Agriculture Libanaise, 39 p.
- COMPTOIR AGRICOLE, 1999.
- Ctifl, 1992. Aubergine Poivron Courgette, Journée d'Information. Centre de Balandran p. 27-35.
- HASSALL, K.A., 1990. The Biochemistry and Uses of Pesticides, 2<sup>nd</sup> Ed., 536p.
- LOUVET, J., 1981. Les problèmes phytopathologiques associés aux cultures en serre et les solutions proposées; Pépiniéristes, Horticulteurs, Maraichers (France), p.p.39-45.
- MINISTERE DE L'AGRICULTURE LIBANAISE, 1997. Statistiques Agricoles.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children, National Academy Press, Washington, p.p.13.
- WIEN, H.C., 1997. The physiology of vegetable crops pp. 345-386.

# L'APPLICATION DU SYSTÈME HACCP SUR LA LIGNE SESAME-TAHINI À L'ENTREPRISE "CONSERVES MODERNES CHTAURA S.A.L."

C. HILAN<sup>1</sup>, K. HAMMOUD<sup>2</sup> et

C. EL CHIDIAC<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherches Agronomiques

Libanais – Fanar, Liban

<sup>2</sup> Entreprise Conserves Modernes

Chtaura – Bekaa, Liban.

<sup>3</sup> Faculté des Sciences Agronomiques,

Université St Esprit Kaslik, Liban

## RÉSUMÉ

*L'analyse ou le contrôle d'un produit sont insuffisants d'un point de vue statistique, pour garantir une qualité et une sécurité complètes. Il est donc nécessaire d'appliquer une technique de gestion de la sécurité alimentaire, telle par exemple, l'analyse HACCP qui permet d'agir de manière préventive dans un système d'Assurance de Qualité.*

*Cette étude de cas a porté sur l'application de la méthode HACCP, à l'entreprise « Conserves Modernes Chtaura s.a.l. », sur la ligne Sésame-Tahini.*

*L'étude de cette ligne, a permis de signaler la présence de dix étapes considérées comme CCP, depuis la réception de la matière première, jusqu'à l'élaboration du produit fini. Ces étapes sont classées d'après l'ordre chronologique de la fabrication:*

*La réception et le stockage de la matière première, le décorticage de la matière première, l'humidification dans le bac, le dernier tamisage, le premier moulage mécanique, le second dur les pierres, le stockage en fûts, le mélange en choemétrol, le remplissage et finalement la fermeture des bouches.*

*Quant aux analyses microbiologiques, les résultats ont montré une croissance microbienne au niveau du bac d'humidification, qui disparaîtra lors de son passage à l'étape des rôtissoires. Par opposition aux contaminations ayant lieu aux étapes ultérieures, et vue l'absence de procédés de stérilisation, la souillure pourra être transportée, parfois, jusqu'au produit fini.*

## **ABSTRACT**

*The analysis or the controls of a product are insufficient from a statistical point of view to assure the quality and complete security. Therefore it is necessary to apply a managing technic of Food Safety, as for example the HACCP analysis which acts in a preventive way in a Food Quality Assurance.*

*This case study is an application of the HACCP method in "Conserves Modernes Chtaura s.a.l.", on two of the factory's principal lines: the Sesame-Tahini line and the Canned-grain line.*

*The study of the Sesame-Tahini line, has signaled the present of ten stages considered as CCP, from the reception of the raw material till the elaboration of the final product. These stages are classified upon their manufacturing chronological order:*

*The reception and storage of the raw material, the dehuller operation, the tank humidification, the final screen, the first milling machine, the second milling stone, the storage in barrels, the mixing in the chæmetrol, the filling and finally closing the bocal.*

*The results of the microbiological analysis have shown a bacterial growth on the humidification tank's stage, which disappear while it passes on the rotissory stage.*

*In opposition, every contamination on the further stages, due to the absence of sterilization procedure, may be the reason to be transported to the final product.*

## **INTRODUCTION**

La maîtrise de la qualité microbiologique des produits est l'un des impératifs majeurs des industries alimentaires. Cette exigence trouve son origine chez les clients consommateurs, chez les distributeurs et également chez les législateurs.

Cette maîtrise de la qualité est généralement obtenue aujourd'hui, mais cela ne suffit plus, et pour conserver une position concurrentielle significative, les entreprises doivent être capables de donner confiance à leurs clients, en leur assurant la qualité. Cette nécessité d'assurer la qualité se matérialise par le développement des certifications d'entreprises selon l'un des référentiels définis par la normalisation internationale ISO 9000 (Cuvellier, 1992).

Les industries ont mis au point une méthode pragmatique, dont la mise en oeuvre relativement simple permet, moyennant au minimum de rigueur, d'assurer la qualité, tant au niveau de la sécurité que de la valeur d'usage (Charreau, 1996).

Cette méthode est dénommée Système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

Apparu aux Etats-Unis au début des années 70, le système HACCP a été utilisé par les laboratoires de l'US Army et de la NASA, en association avec la compagnie Pillsbury, notamment pour la conception et la production de l'alimentation des astronautes. A cette époque, la sécurité alimentaire était basée sur le contrôle du produit fini, les résultats n'étaient point satisfaisants. Il a apparu clairement que le système préventif était mieux recommandé. La sécurité des produits finis était davantage garantie (Mortimore et Wallace, 1994).

Le présent travail consiste en une application du système HACCP dans une entreprise agro-alimentaire libanaise. « Conserves Modernes Chtaura (CMC) » est parmi les rares industries au Liban qui s'intéresse à l'amélioration continue de la qualité de ses produits, afin de garantir la satisfaction de ses clients et d'accroître sa part au marché concurrent.

Une étude a été faite sur la ligne de Sésame-Tahini. Des analyses microbiologiques, physiques, chimiques et même économiques ont été également établies sur les différents points de contrôle afin de mieux maîtriser la situation et d'élaborer le plan HACCP propice et efficace.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude avait deux perspectives différentes, et nécessitait l'utilisation de matériel, de deux endroits également différents et assez distants. D'une part le matériel utilisé au laboratoire de l'entreprise CMC, pour les analyses physico-chimiques et même économiques de la Tahini, et d'autre part, le matériel utilisé



au laboratoire de l'IRAL (Institut de Recherches Agronomiques Libanaises), nécessaire pour les analyses microbiologiques.

Hormis la bonne manipulation des instruments de laboratoires, l'application des quatorze étapes du HACCP sur chaque point du procédé, serait la méthode fondamentale à suivre afin d'aboutir à un travail clair et réussi (FLAIR, 1995).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après avoir défini le champ d'étude, qui consistait à analyser les dangers qui interviennent au niveau de la ligne Sésame-Tahini (depuis la réception de la matière première jusqu'à l'élaboration du produit fini), l'entreprise CMC s'est bien engagée dans la sélection des membres de l'équipe. Celle-ci était pluridisciplinaire et constituée d'éléments bien compétents. Des réunions, des conférences ainsi que le recours à des sources d'informations avaient toujours lieu (NMFS, 1993).

L'étape suivante consistait à rassembler les données relatives du produit : les graines de sésame provenait, principalement du Soudan pour la production excellente, et de la Chine et du Niger pour les productions de catégories inférieures. Les caractéristiques du produit doivent être comme suit :

- Viscosité :  $5 \pm 1$  cm/30s selon la méthode de « Bostwick reading ».
- Couleur :  $L= 51.85-53.82$  ;  $a= 8.5$  ;  $b= 18.45-19.28$  ( pour la Tahini sans addition de titanium).  
 $L= 54.07$  ;  $a= 8.55$  ;  $b= 16.97$  (pour la Tahini additionnée au titanium).
- Texture : la taille des particules de Tahini doit être inférieure à 50 microns.

Pour l'utilisation finale de la Tahini : ce produit est destiné à tout consommateur, il est utilisé dans l'assaisonnement de plusieurs plats libanais (Hommos et Tahini, Baba Ghannouj, Taratour,..) ainsi que dans la fabrication du Halawa. Généralement la durée de conservation de la Tahini est assez longue vue la nature huileuse du produit. La consommation est de préférence avant deux ans.

Après construction du diagramme de fabrication, les étapes du process étaient sous contrôle permanent, des responsables des secteurs de qualité et de production circulaient en permanence entre les lignes, afin de vérifier et d'affirmer le bon déroulement du travail (fig.1).

Les sept étapes qui suivent constituent les sept principes fondamentaux du HACCP reconnus au niveau international. Ces principes correspondent d'une part aux différentes étapes nécessaires à l'établissement du système, et d'autre part, ils définissent les principales fonctions qui font du HACCP un système de maîtrise des dangers (Jouve, 1993).

Dix étapes ont été reconnues comme points critiques de contrôle, et ceci d'après l'arbre de détermination des CCP (Tab.1) (FLAIR, 1995). A chaque CCP, les dangers, les mesures préventives, les limites critiques, les procédures de surveillance, et les actions correctives ont été établies. La vérification de la documentation se fera ultérieurement à l'usine au fur et à mesure qu'il y aurait déviation au niveau des CCP et élaboration d'actions correctives. Il serait intéressant de signaler qu'un manuel de GMP (Good Manufacturing Practices) a été conçu dans les normes, spécialement pour la chaîne de Tahini, les travaux quotidiens, hebdomadaires et mensuels à effectuer avec le temps nécessaire seront indiqués, afin que le but désiré soit facilement atteint (Wilbur et Gould, 1990).

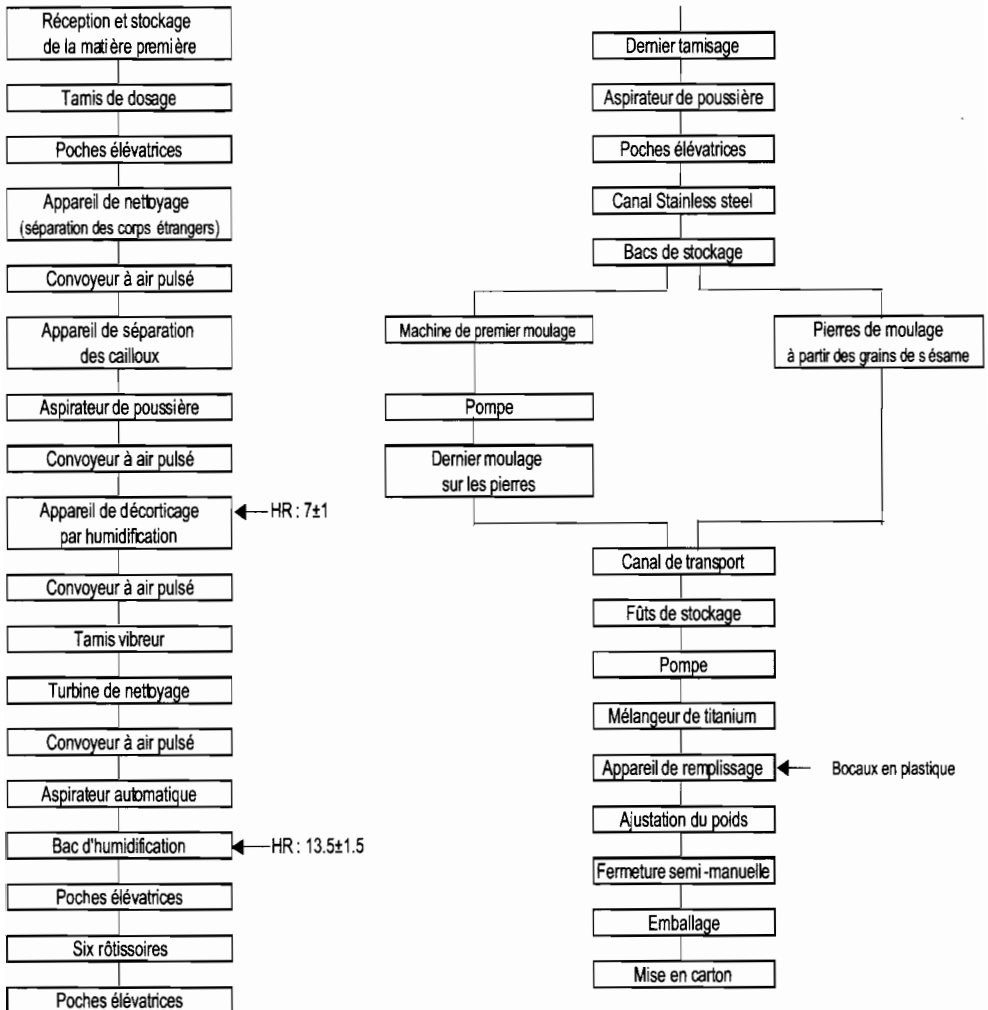


Fig. 1 : Le diagramme de production de la ligne de Sésame-Tahini.

**Tab.1 : Détermination des CCP.**

<b>Etapes de fabrication</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	<b>C</b> CP
<b>1</b>	OUI	NON	OUI	NON	+(CCP1)
<b>2</b>	OUI	NON	OUI	OUI	-
<b>3</b>	OUI	NON	NON		-
<b>4</b>	NON	NON			-
<b>5</b>	OUI	OUI			+(CCP2)
<b>6</b>	OUI	OUI			+(CCP3)
<b>7</b>	OUI	OUI			-
<b>8</b>	OUI	OUI			-
<b>9</b>	OUI	OUI			+(CCP4)
<b>10</b>	OUI	OUI			-
<b>11</b>	OUI	NON	NON		-
<b>12 et 13</b>	OUI	NON	NON		+(CCP5)
<b>14</b>	OUI	NON	OUI	NON	+(CCP6)
<b>15</b>	NON				+(CCP7)
<b>16</b>	OUI	OUI			+(CCP8)
<b>17 et 18</b>	OUI	NON	OUI	NON	+(CCP9)
<b>19</b>	OUI	OUI			+(CCP10)
<b>20</b>	OUI	NON	NON		-

En ce qui concerne les analyses microbiologiques, il a été remarqué une croissance de coliformes fécaux et de Staphylocoques dorés au niveau du bac d'humidification (fig.2 et 3). Mais il serait très intéressant de préciser que toute cette charge microbienne disparaîtra lors de son passage à l'étape suivante celle des rôtissoires (fig.4). En est la preuve la stérilité quasi-totale des grains de sésame pris du bac après passage aux rôtissoires, pour une température de 90 à 120°C pendant un temps de 30 minutes. Pour les échantillons pris de la machine

du premier moulage (fig. 5 et 6), des pierres de second moulage (fig.7 et 8), des fûts de stockage (fig.9 et 10), du choemétrol, et de l'appareil de remplissage (fig.11 et 12), les analyses du premier test ont montré le développement de coliformes, qui de préférence devra être absent (Codex Alimentarius, 1993). Alors que pour les résultats de la seconde analyse, il a été observé la disparition quasi-totale des coliformes, mais l'apparition d'une croissance fongique à partir des pierres du second moulage.

La présence de coliformes fécaux, lors de la première analyse, pourra avoir comme origine une mauvaise lutte contre les rongeurs. Et suite à l'absence de procédés stérilisateurs à la fin de la ligne de fabrication (non pas due à la non-chalence de l'entreprise CMC, mais aux conditions traditionnelles qu'exige la production de la Tahini), la contamination sera transportée d'une étape à l'autre, et parfois jusqu'au produit fini.



Fig.2 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du premier test du bac d'humidification

Fig.3 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du second test du bac d'humidification

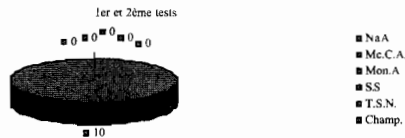


Fig.4 - Diagramme montrant les analyses microbiologiques du premier et du second tests du bac de sésame après sortie des rôtissoires



Fig.5 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du premier test effectué sur la Tahini extraite de la machine du premier moulage

Fig.6 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du second test effectué sur la Tahini extraite de la machine du premier moulage



Fig.7 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du premier test effectué sur la Tahini extraite des pierres du second moulage

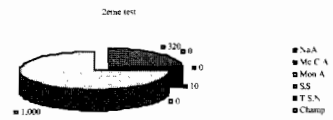


Fig.8 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du second test effectué sur la Tahini extraite des pierres du second moulage

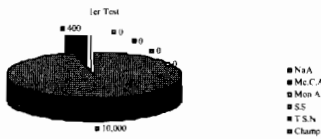


Fig.9 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du premier test effectué sur la Tahini extraite des fûts de stockage

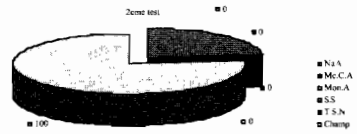


Fig.10 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du second test effectué sur la Tahini extraite des fûts de stockage

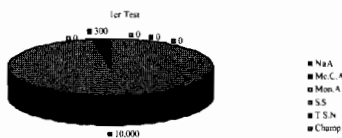


Fig.11 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du premier test effectué sur la Tahini extraite de l'appareil de remplissage

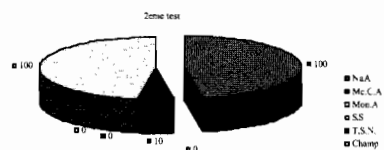


Fig.12 - Diagramme montrant l'analyse microbiologique du second test effectué sur la Tahini extraite de l'appareil de remplissage

■ NaA : Nutrient Agar  
 ■ Mc. C.A : Mc Conkey Agar  
 ■ Mon. A : Monnitol Salt Agar

■ S.S : Salmonella-Shigella Agar  
 ■ T.S.N : Tryptose Sulfite Neomycine  
 Champ. : Sabouraud Agar

Par contre, pour les analyses effectuées ultérieurement, il a été remarqué la disparition des coliformes suite à la prise d'actions correctives (l'installation d'appareils à ultra-son, létal pour les rongeurs). L'apparition du développement fongique à partir des pierres de second moulage, bien qu'il ne constitue pas une source de danger pour le consommateur, il peut toutefois altérer les caractères organoleptiques, constituants importants des caractéristiques du produit. Ce phénomène a pour origine, d'une part, l'atmosphère humide de l'usine, à cause de la vapeur dégagée par les machines de fabrication des confitures, des conserves, etc., et d'autre part, le taux d'humidité élevé des grains de sésame avant leur passage aux pierres.

Ainsi, même après séchage à l'air chaud des pierres, la présence des micro-particules d'humidité pourrait, dans des conditions de croissance favorables aux spores fongiques (facilement dispersables), déclencher le développement de ces levures et moisissures.

## CONCLUSION

D'après les analyses microbiologiques effectuées, il a été démontré que les dernières étapes constituent toutes des CCP (vue l'absence d'étapes stérilisatrices avant l'élaboration du produit fini).

L'application de la thindernisation, qui consiste en un chauffage à 65-70°C à plusieurs reprises (Lhoutellier, 1995), pourrait être une proposition pour éliminer la souillure du lot, au lieu que cette dernière ne provoque sa destruction. Ce phénomène n'est pas encore appliqué à la chaîne Tahini, une recherche plus détaillée de la possibilité de son application pourra constituer une continuité à cette présente étude.



**BIBLIOGRAPHIE**

- CHARREAU A., 1996. Hygiène et sécurité, tout savoir sur le système HACCP. *Filière gourmande*, n°32, 31-34 pp.
- Codex Alimentarius, 1993. Guidelines for the application of the hazard analysis critical control point system. Alinorm 93/13 A, appendix II.
- CUVELLIER G., 1992. Du contrôle qualité à l'accréditation et la certification. *Cerevisia and biotechnology*, vol.17, n°3, 37-43 pp.
- FLAIR, 1995. Guide d'utilisation du HACCP. Action concertée n°7, sans lieu.
- JOUVE J-L, 1993. La qualité microbiologique des aliments, maîtrise et critère. Edition Polytechnica, Paris, vol 1.
- LHOUTELLIER P., 1995. La méthode HACCP: Principes et mise en œuvre. *Maîtrise de la qualité microbiologique*, vol 16, n°6, 189-192 pp.
- MORTIMORE S. & WALLACE C., 1994. HACCP a practical approach. Chapman & Hall, 1ère édition, Londres, 294 pp.
- National Marine Fisheries Services, 1993. National training branch: Student Workbook.
- WILBUR A. & GOULD Ph-D, 1990. Good Manufacturing Practices for Food Manufacturers. Baltimore, Maryland, 71 pp.

## ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES HUILES D'OLIVE VIERGES PAR RAPPORT AUX TYPES DE RÉCIPIENTS UTILISÉS DURANT LE STOCKAGE

C. HILAN<sup>1</sup>, H. FANNOUS<sup>1</sup> et  
R. FRANCIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut de recherches agronomiques  
- IRAL - Laboratoire de Fanar

<sup>2</sup> Université Saint-Esprit / Kaslik - USEK -

### RÉSUMÉ

*L'évolution de la qualité de l'huile a été étudiée en fonction des conditions du stockage dans cinq types de récipients: verre, plastique, fer blanc, aluminium et argile, pendant une durée de stockage de neuf mois et à deux différentes températures ambiantes ( $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et  $23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$ ). Les paramètres étudiés: Indice d'acidité, Indice de peroxyde, Indice d'iode et pourcentage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse, ont montré qu'aucun type de récipient utilisé pour le stockage des huiles d'olive vierges, ne peut leur assurer une qualité physico-chimique totalement inchangée pendant une durée dépassant un an. Le récipient en Aluminium est le meilleur à conserver la qualité de l'huile; il la protège contre l'oxydation par la couche protectrice d'oxyde d'aluminium qui se forme sur les parois du récipient au cours du temps. Les récipients en Verre, Argile et Fer blanc sont eux aussi capables de conserver la qualité de l'huile, mais à un degré moindre que celui en Aluminium. Les récipients en plastique sont déconseillés pour le stockage de l'huile pour une longue durée; ils provoquent, après neuf mois de stockage, l'altération complète de l'huile. La différence ou même l'augmentation de la température ambiante du local de conservation a un effet indésirable sur l'augmentation de l'acidité et l'état d'oxydation de l'huile durant le stockage à des degrés différents, et selon les types de récipients utilisés.*

## INTRODUCTION

L'huile d'olive est une denrée principale de l'alimentation mondiale et particulièrement libanaise. Cette huile produite en quantité suffisante est souvent conservée pour une durée moyenne d'un an et demi. La conservation de la qualité de l'huile d'olive est intimement liée aux techniques employées pour son stockage. S'agissant d'une matière grasse, l'huile a tendance à s'oxyder et à subir des altérations aussi bien du point de vue chimique et physique qu'organoleptique. A cet égard il s'est avéré utile de mener une étude sur les conditions de stockage de cette huile dans le but de connaître, le meilleur type de récipients ainsi que la meilleure température de stockage, et offrir au consommateur, un produit de qualité, dont les caractéristiques chimiques, physiques et organoleptiques demeurent autant que possible inchangées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

27 lots d'huile d'olive vierge ont été retirés de différents pressoirs du sud libanais. Le test d'acidité a été effectué, se basant sur les normes internationales du codex Alimentarius FAO et OMS (1993) en vue de classer l'huile d'olive vierge. Trois lots ont été identifiés : 1<sup>er</sup> lot : huile d'olive extra (classe 1), dont l'acidité est de 0,8%. 2<sup>ème</sup> lot : huile d'olive vierge fine (classe 2), dont l'acidité est de 2%. 3<sup>ème</sup> lot : huile d'olive courante (classe 3), dont l'acidité est de 3,2%.

Chaque lot est réparti ensuite en 10 échantillons : selon 5 types de récipients et à deux températures différentes. Ces récipients sont en : Verre opaque couleur foncée - Plastique - Fer blanc - Aluminium - Argile vernis. Les échantillons ont été soumis à deux températures ambiantes différentes.  $t_1$  : à l'intérieur des locaux (dans une armoire bien fermée) équivalente à  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ .  $t_2$  : à l'extérieur, ajoutée de l'effet de la chaleur solaire (à la fenêtre du laboratoire d'analyse des échantillons) équivalente à  $23 \pm 7^\circ \text{C}$ .

Le facteur luminosité est totalement supprimé en mettant les récipients dans une boîte en bois couverte de deux sacs en plastique noire bien fermés. Les analyses ont été effectuées à trois reprises : la première dès la collecte des échantillons, la seconde après 6 mois et la troisième après 9 mois. Les paramètres étudiés sont : L'indice d'acide (Ia), l'indice de peroxyde (Ip) et l'indice d'iode (Ii) par la titrimétrie normalisée par l'AOAC(1990). L'analyse des acides gras présents effectuée par chromatographie en phase gazeuse

d'après l'AOAC (1990), Linden et Lorient (1994), Lavoue (1989) et Alais et Linden (1987).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de ces analyses était de savoir l'effet de la qualité du récipient sur la conservation des caractères physico-chimiques et organoleptiques de l'huile durant le stockage, et de savoir l'effet de la variation de la température ambiante du milieu de stockage sur la variation de la qualité des huiles d'olive étudiées. Les résultats sont comparés aux normes de la FAO. O.M.S (codex Alimentarius, 1993) et les normes Européennes lancées par feinberg (1991). Ainsi, pour chaque genre d'huile et pour chaque type de récipient mis à deux différentes températures, les résultats sont donnés par des tableaux suivants.

## 1) Evolution de l'acidité :

**Tab. 1.** Evolution de l'indice d'acide (Ia) de l'huile d'olive stockée dans différents types de récipients à deux différentes températures ambiantes.

Température	$t_1 = 23^\circ \pm 7^\circ \text{C}$															
	$t_1 = 20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$															
	Ia < 1%		1,5% < Ia < 3%		3% < Ia < 3,3%		Ia < 1%		1,5% < Ia < 3%		3% < Ia < 3,3%					
Type de l'huile	Extra		Fine		Courante		Extra		Fine		Courante					
Durée de Stockage	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois				
Verre	0,8	1,0	1,1	2	2	2,1	3,2	3,3	0,8	1,2	1,15	2	2,1	2,2	3,2	3,3
Plastique	0,8	1,0	1,2	2	2,2	2,3	3,2	3,3	0,8	0,95	1,15	2	2,24	2,32	3,2	3,27
Fer Blanc	0,8	0,95	1,15	2	2,1	2,1	3,2	3,3	0,8	1,1	1,1	2	2,1	2,12	3,2	3,3
Aluminium	0,8	1,05	1,2	2	2	2,1	3,2	3,3	0,8	1,1	1,1	2	2,2	2,2	3,2	3,27
Argile	0,8	1,0	1,0	2	2,1	2,05	3,2	3,25	0,8	1,0	1,15	2	2,32	2,32	3,2	3,27

\* h.f. = huile fraîche

L'évolution de l'indice d'acide est presque uniforme pour tous les types de récipients ne dépassant pas, dans la majorité des cas, la limite normale. Mais cette évolution est plus importante dans l'huile stockée dans les récipients en plastique.

En plus, les évolutions des indices d'acide sont presque les mêmes pour les 2 températures étudiées et pour les 5 types de récipients.

## 2) Evolution de l'indice de peroxyde :

**Tab. 2:** Evolution de l'indice de peroxyde (Ip) de l'huile d'olive stockée dans différents types de récipients à deux différentes températures ambiantes.

Température		$t_a = 23^\circ \pm 7^\circ \text{C}$																	
Norme Internationale		$t_a = 20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$																	
Type de l'huile		Ip $\leq$ 20 még. d'O <sub>2</sub> / Kg d'huile						Ip $\leq$ 20 még. d'O <sub>2</sub> / Kg d'huile											
Durée de Stockage		Extra		Fine		Courante		Extra		Fine		Courante							
		h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois						
Verre		12	12	13	10	12	13	12	12	15	12	12	15	18	12	16	12	18	20
Plastique		12	12	13	10	13	14	12	19	21	12	19	21	20	42	10	77	39	50
Fer Blanc		12	11	11	10	14	15	12	19	19	12	12	19	12	12	10	14	19	20
Aluminium		12	8	8	10	12	12	12	19	20	12	8	10	10	10	12	13	19	20
Argile		12	13	13	10	14	9	12	19	19	12	13	14	10	15	20	12	19	20

\* h.f. = huile fraîche

Les résultats présents dans le tableau 2 montrent que l'indice de peroxyde évolue rapidement durant les 9 mois de stockage de l'huile dans les divers types de récipients utilisés. L'évolution va de la limite de l'acceptable et dépasse dans les récipients en plastique cette limite d'une façon très grave. Ces résultats montrent de plus que l'aluminium est le récipient le moins affecté par la présence d'oxygène actif, parce qu'il utilise cet oxygène pour y former une couche protectrice d'oxyde d'aluminium.

Les résultats montrent, de même, que l'évolution de l'indice de peroxyde à  $t_2$  est plus importante qu'à  $t_1$ , surtout pour l'huile stockée dans les récipients en plastique. Pour le verre, cette augmentation est moindre; alors que pour le fer blanc, l'aluminium et l'argile, l'évolution de l'indice de peroxyde est presque la même pour les 2 types de température utilisés.



### 3) Evolution de l'indice d'iode :

**Tab. 3:** Evolution de l'indice d'iode (Ii) de l'huile d'olive stockée dans différents types de récipients à deux différentes températures ambiantes.

Température Norme Internationale	t <sub>1</sub> = 20° ± 2° C												t <sub>1</sub> = 23° ± 7° C									
	75% < Ii < 94%												75% < Ii < 94%									
	Extra			Fine			Courante			Extra			Fine			Courante						
Type de l'huile	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	h.f.	6 mois	9 mois	
Verre	81	80,79	80,62	85,69	85,1	84,9	83,4	82,35	81,24	81	80,2	79,11	85,69	84,6	84,45	83,4	82,4	81,06				
Plastique	81	81	80,21	85,69	85	82,7	83,4	82,3	81,6	81	79,11	78,3	85,69	78,5	72,21	83,4	76,46	73,61				
Fer Blanc	81	80,3	80,3	85,69	84,91	82,5	83,4	82,4	82,4	81	80,7	79,8	85,69	84,03	82,88	83,4	82,06	81,62				
Aluminium	81	80,5	80,33	85,69	85,5	85,3	83,4	82,53	81,7	81	80,22	80,19	85,69	85,3	85,22	83,4	83,24	81,21				
Argile	81	80,5	80,2	85,69	82,4	81,6	83,4	82,5	81,9	81	80,41	80,06	85,69	84,6	81,7	83,4	81,58	81,22				

\* h.f. = huile fraîche

Les résultats du tableau 3 montrent que la diminution de (Ii) durant le stockage est variable selon le type de récipients. Une diminution très importante est observée au niveau de l'huile stockée dans le récipient en plastique. Pour l'argile cette diminution est moindre mais elle est encore importante ainsi que pour les récipients en fer blanc. Pour le verre et l'aluminium, elle est faible.

Ces résultats montrent encore que l'évolution de l'indice d'iode est restée dans la limite normale (75% et 94%) sauf dans le plastique. Ils montrent de même, que la diminution de l'indice d'iode est plus importante à  $t_2$  qu'à  $t_1$ . Cette sensibilité à l'évolution de la température est très grande au niveau du plastique et elle est presque négligeable au niveau des autres types de récipients.

#### 4) Evolution de la composition en acides gras de l'huile d'olive :

**Tab. 4:** Evolution de la composition en acides gras de l'huile d'olive vierge extra, après 9 mois de stockage stockée dans différents types de récipients, à la température de  $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et à la température de  $23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$ .

% a.gras/ récipients	$20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$														
	Verre			Plastique			Fer blanc			Aluminium			Argile		
	a	b	c	A	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
C <sub>16</sub>	12,0	12,6	12,7	12,0	12,7	13,0	12,0	12,1	12,6	12,0	12,0	12,3	12,0	12,2	12,2
C <sub>18</sub>	3,1	3,2	3,2	3,1	3,2	3,2	3,1	3,1	3,2	3,1	3,1	3,2	3,1	3,2	3,2
C <sub>18'</sub>	73,3	73,6	73,6	73,3	73,1	72,9	73,3	73,2	73,2	73,3	73,4	73,4	73,3	73,1	73,0
C <sub>18''</sub>	9,6	9,3	9,3	9,6	9,1	9,1	9,6	9,6	9,5	9,6	9,7	9,5	9,6	9,6	9,6
C <sub>18'''</sub>	0,6	0,6	0,57	0,6	0,58	0,57	0,6	0,58	0,58	0,6	0,58	0,57	0,6	0,56	0,55

\*\*\* a = huile fraîche      b = Après 6 mois      c = Après 9 mois

% a.gras/ récipients	$23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$														
	Verre			Plastique			Fer blanc			Aluminium			Argile		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
C <sub>16</sub>	12,0	12,6	12,8	12,0	12,7	13,5	12,0	12,9	13,0	12,0	12,3	12,3	12,0	12,6	12,6
C <sub>18</sub>	3,1	3,1	3,0	3,1	3,1	3,7	3,1	3,0	2,9	3,1	3,2	3,2	3,1	3,2	3,2
C <sub>18'</sub>	73,3	73,2	73,2	73,3	73,1	73,0	73,3	73,1	73,3	73,3	73,1	73,1	73,3	73,3	73,3
C <sub>18''</sub>	9,6	9,4	9,2	9,6	7,6	5,3	9,6	9,4	9,2	9,6	9,4	9,4	9,6	9,1	9,0
C <sub>18'''</sub>	0,6	0,58	0,56	0,6	0,52	0,5	0,6	0,58	0,56	0,6	0,57	0,54	0,6	0,55	0,54

\*\*\* a = huile fraîche      b = Après 6 mois      c = Après 9 mois

**Tab. 5:** Evolution de la composition en acides gras de l'huile d'olive vierge fine stockée dans différents types de récipients, après 9 mois de stockage, à la température de  $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  à la température de  $23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$ .

**$20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$**

% a.gras/ récipients	Verre			Plastique			Fer blanc			Aluminium			Argile		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
C <sub>16</sub>	11.7	11.9	12.0	11.7	11.9	12.3	11.7	11.9	12.1	11.7	11.9	12.0	11.7	12.1	12.1
C <sub>18</sub>	3.3	3.3	3.4	3.3	3.4	3.5	3.3	3.3	3.4	3.3	3.3	3.3	3.3	3.4	3.4
C <sub>18'</sub>	72.0	71.8	71.0	72.0	71.3	70.9	72.0	72.1	71.8	72.0	71.9	71.4	72.0	71.2	71.2
C <sub>18''</sub>	11.9	11.6	10.0	11.9	9.1	8.7	11.9	11.2	11.1	11.9	10.3	10.3	11.9	11.4	10.4
C <sub>18'''</sub>	0.6	0.57	0.5	0.6	0.48	0.46	0.6	0.57	0.57	0.6	0.56	0.54	0.6	0.57	0.57

\*\*\* a = huile fraîche

b = Après 6 mois

c = Après 9 mois

**$23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$**

% a.gras/ récipients	Verre			Plastique			Fer blanc			Aluminium			Argile		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
C <sub>16</sub>	11.7	12.5	12.8	11.7	11.6	13.3	11.7	12.2	12.2	11.7	11.8	12.3	11.7	13.3	13.0
C <sub>18</sub>	3.3	2.2	3.5	3.3	3.6	3.7	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.4	3.3	3.3	3.4
C <sub>18'</sub>	72.0	71.9	71.0	72.0	72.1	71.9	72.0	72.0	72.0	72.0	71.8	71.8	72.0	71.4	71.4
C <sub>18''</sub>	11.9	11.7	9.8	11.9	9.1	9.4	11.9	10.9	9.4	11.9	10.4	9.4	11.9	10.2	10.2
C <sub>18'''</sub>	0.6	0.56	0.5	0.6	0.52	0.51	0.6	0.57	0.55	0.6	0.56	0.54	0.6	0.56	0.56

\*\*\* a = huile fraîche

b = Après 6 mois

c = Après 9 mois

**Tab. 6:** Evolution de la composition en acides gras de l'huile d'olive vierge courante stockée dans différents types de récipients, après 9 mois de stockage, à la température de  $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et à la température de  $23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$ .

% a.gras/ récipients	Verre			Plastique			Fer blanc			Aluminium			Argile		
	a	b	c	A	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
	$20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$	10.6	11.2	11.8	10.6	12.8	12.7	10.6	10.5	11.3	10.6	10.6	10.6	10.6	11.1
$C_{16}$	3.4	3.3	3.1	3.4	3.4	3.46	3.4	3.5	3.5	3.4	3.3	3.6	3.4	3.5	3.6
$C_{18}$	73.4	73.4	73.0	73.4	73.0	72.2	73.4	73.3	73.3	73.4	73.3	73.1	73.4	73.0	73.0
$C_{18:1}$	9.1	9.2	8.8	9.1	8.6	8.5	9.1	9.0	8.7	9.1	8.8	8.8	9.1	9.2	9.0
$C_{18:2}$	0.8	0.73	0.7	0.8	0.75	0.69	0.8	0.78	0.76	0.8	0.78	0.75	0.8	0.75	0.73

\*\*\* a = huile fraîche

b = Après 6 mois

c = Après 9 mois

% a.gras/ récipients	Verre			Plastique			Fer blanc			Aluminium			Argile		
	a	b	c	A	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
	$23^{\circ} \pm 7^{\circ}\text{C}$	10.6	11.2	11.8	10.6	11.5	12.7	10.6	11.7	11.7	10.6	11.3	10.4	10.6	11.0
$C_{16}$	3.4	3.5	3.5	3.4	3.5	3.8	3.4	3.3	3.3	3.4	3.5	3.6	3.4	3.5	3.5
$C_{18}$	73.4	73.1	73.0	73.4	73.0	72.8	73.4	73.3	72.3	73.4	73.1	72.8	73.1	73.0	73.0
$C_{18:1}$	9.1	9.0	9.0	9.1	8.9	8.3	9.1	8.8	8.6	9.1	8.9	8.8	9.1	9.0	9.0
$C_{18:2}$	0.8	0.74	0.7	0.8	0.73	0.65	0.8	0.78	0.76	0.8	0.78	0.74	0.8	0.73	0.71

\*\*\* a = huile fraîche

b = Après 6 mois

c = Après 9 mois

Tous les résultats signalés dans les tableaux 4 - 5 et 6 prouvent que le plastique présente la plus grande évolution dans la composition en acides gras de ces huiles, et ceci au niveau des 3 classes d'huiles étudiées, et concernant tous les types d'acides gras analysés.

Les autres types de récipients : verre, fer blanc, Aluminium et Argile, présentent des évolutions négligeables dans la composition en acide gras des trois classes d'huile d'olive; mais l'évolution est restée dans les limites normales (Feinberg, 1991).

- En général, l'acide palmitique et l'acide stéarique augmentent avec le stockage. Tandis que les acides oléiques, linoléiques et linolériques diminuent.
- La comparaison au sein de chaque tableau 3 - 4 et 5 montre que le récipient le plus affecté par la variation de la température est le plastique. Tandis que pour les autres types de récipients, la variation de la composition en acides gras des huiles, dans les trois classes étudiées en fonction de la température est négligeable.

## CONCLUSION

D'après les résultats des analyses sus détaillées, il s'avère que l'augmentation de la température ambiante du local de conservation a un effet indésirable sur le taux de l'acidité et l'état d'oxydation de l'huile durant le stockage selon les types de récipients utilisés.

Concernant les types de récipients utilisés pour le stockage, il a été démontré de qui suit :

\* *Le verre* : Il est capable de conserver un taux d'acidité ainsi qu'un taux d'oxydation normaux pendant toute la durée de stockage. De même, sa résistance à la température bien qu'elle ne soit pas absolue, elle est meilleure que celle du plastique.

\* *Le plastique* : L'huile stockée dans les récipients en plastique a présenté après 9 mois de stockage un taux très élevé d'oxydation . L'huile altérée est devenue inconsommable. A ajouter, que la composition de l'huile en acides gras a énormément varié durant ces 9 mois induisant un taux de saturation très élevé de la matière grasse.

De même, ce type de récipient a présenté une sensibilité très prononcée à l'augmentation de la température ambiante. En conséquence, ce n'est pas le type de récipient à conseiller pour le stockage des huiles d'olive vierge.

\* *Le Fer blanc* : Comme le verre, il est capable de conserver, à l'huile une qualité plus ou moins normale durant le stockage, du point de vue oxydation et composition en acide gras de l'huile. Il présente de même, une résistance à l'augmentation de la température ambiante du local de stockage, similaire à celle des récipients en verre.

\* *L'Aluminium* : C'est le meilleur récipient pour la conservation de l'huile d'olive vierge, il a présenté la meilleure capacité de conservation de la qualité physico-chimique de l'huile ainsi qu'une résistance suffisante à l'augmentation de la température ambiante du local de stockage. Donc, il est le premier à conseiller pour la conservation de l'huile d'olive.

\* *L'Argile* : Bien qu'il présente une résistance assez élevée à l'augmentation de la température ambiante du local de stockage, sa perméabilité le rend incapable de conserver une qualité inchangée de l'huile d'olive vierge. Après 9 mois de stockage, cette huile reste consommable.

Par conséquent, on peut classifier, les différents types de récipients utilisés pour le stockage, par ordre décroissant, de la manière suivante :

- Aluminium → conservation excellente.
- Verre - Fer blanc → bonne conservation.
- Argile → bonne conservation mais risquée.
- Plastique → conservation médiocre, déconseillée.



## BIBLIOGRAPHIE

- ALAIS C. et LINDEN G., 1987. Biochimie alimentaire, Masson, Paris, 224 P.P.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis, fifteenth edition, USA, I et II, 10254 P.P.
- FAO et OMS, 1993. Codex alimentarius, Graisses huiles et produits dérivés, 2ème éditions, Rome, 8, 127 P.P.
- FEINBERG, 1991. Répertoire général des aliments, I, table de composition des corps gras, Tec. et Doc., La Voisier, Paris, 400 P.P.
- LAVOUE C.F, 1989. La Chromatographie en phase gazeuze et ses applications, La Voisier, Paris, 400 P.P.
- LINDEN G. et LORIENT D., 1994. Biochimie agro. Industrielle. Masson, Paris, 289 P.P.

# ESSAI D'UNE CULTURE D'ENDIVE AVEC FORCAGE EN MILIEU HYDROPONIQUE DANS DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE NITRATES

J. NOUN et A. KHOURY

Université Saint-Esprit de Kaslik  
Faculté des Sciences Agronomiques  
B.P. 446 Jounieh-Liban-

## RÉSUMÉ

*L'endive (**Cichorium intybus var. foliosum L.**) constitue une culture d'introduction récente au Liban. Un essai de sa culture, sous-serre, était mené sur le terrain expérimental de l'Université Saint-Esprit Kaslik. Il a permis d'obtenir des racines qui, arrachées puis conservées à 0°C, ont subi, un mois plus tard, le forçage hydroponique pour une durée de 19 jours en Avril 1999. Un nombre de 270 racines de deux diamètres,  $D1 > 3$  cm et  $D2 < 3$  cm, ont été forcées dans trois types de solutions nutritives à trois niveaux d'azote: N1 (2.538 mé/l), N2 (6.687 mé/l) et N3 (12.387 mé/l). Trois répétitions sont adoptées et 18 lots sont observés. L'analyse des paramètres de qualité a porté sur le poids, le diamètre et la longueur des chicons, le poids des radicelles et la teneur en nitrates foliaires. Ainsi concernant la longueur des chicons tous les traitements ont donné des chicons extra selon les normes adoptées. Au niveau de D1, les résultats ont montré des chicons de qualité pour les traitements N1 et N2 en ce qui concerne le poids des chicons et le poids des radicelles. D'autant plus les résultats obtenus avec N1 (nitrates faibles) ont été meilleurs que ceux obtenus avec N2 recommandé, notamment en terme de taux de nitrate foliaire. Pour D2 (faible diamètre), les traitements n'ont pas été satisfaisants. La réussite de cet essai avec des techniques simples encourage la production sous-serre des racines et la généralisation du forçage hydroponique.*

**Mots clés:** Endive, **Cichorium intybus var. foliosum**, Culture hydroponique, Production sous-serre, Nitrates foliaires.

## INTRODUCTION

L'endive est un légume très apprécié dans le monde, surtout en France qui assure seule 55% de la production mondiale (Chaux et Foury, 1994). Au Liban, ce légume devient de plus en plus populaire, son prix est relativement élevé par rapport aux autres légumes. Des tentatives défectueuses de sa production locale étaient menées ces dernières décennies. Actuellement, l'importation assure à elle seule les besoins du marché local estimés à environ 66 tonnes par an (Ministère de l'Agriculture Libanaise, 1996-1997).

L'importance du marché de l'endive pour le Liban et le souci de développer de nouvelles cultures afin de diversifier les revenus des agriculteurs et de réduire l'importation constituent la problématique de cette initiative de recherche dans ce domaine. L'objectif étant d'assurer une production locale qui répond aux besoins du marché local avec des produits de qualités comportant des chicons de taille et d'aspect acceptables avec un niveau de nitrates en-dessous des normes internationales.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Lieu d'exécution de l'expérience

L'expérience a été effectuée dans le terrain expérimental de la Faculté des Sciences Agronomiques à Jbeil pour la production de racines sous-serre puis dans les laboratoires de la faculté à Kaslik pour le forçage hydroponique.

### Production de racines sous-serre

Une nouvelle méthode de culture sous-serre est adoptée sur une parcelle de 50 m<sup>2</sup> de surface. Une analyse physico-chimique du sol est effectuée. Après préparation du sol, un semis direct à la volée est pratiqué avec 2 grammes de la variété Witloof (Zoom hybride F1). Après cinq mois de culture, de novembre jusqu'à fin mars 1999, les racines sont récoltées puis effeuillées à 3 cm au-dessus du collet pour ne pas abîmer le bourgeon principal. Ensuite elles sont conservées à froid à 0°C pendant un mois avec triage selon deux diamètres D1 <3cm et D2 >3cm pour le forçage.

### Forçage hydroponique

Après conservation, les racines sont forcées en culture hydroponique dans trois solutions nutritives avec trois niveaux d'azote N1 (2.538 mé/l), N2 (6.687 mé/l) et N3 (12.387 mé/l). Les bacs de plantation des racines sont bricolés à

l'aide de "paniers d'oignon" couverts du nylon noir pour retenir l'eau à l'intérieur. Une chambre noire isotherme est utilisée où la température et l'humidité sont maintenues à 20°C et à 95 % respectivement. Leur contrôle est effectué à l'aide de jute mouillé couvrant le plancher, le plafond et les murs de toute la chambre. Les racines sont coupées d'une longueur de 15 cm et sont mises dans les bacs où la solution nutritive était à 3 cm au fond des bacs. La disposition des racines dans les bacs était comme suit: pour chaque solution N1, N2 ou N3, il y avait 3 répétitions. Chaque répétition comprend deux diamètres D1 et D2 de 15 racines chacune. Donc 90 racines pour chaque solution et 270 racines au total. L'irrigation des bacs est assurée par un réseau de tuyaux de 16 mm; Dans chaque répétition, la solution nutritive est pompée dans le bac le plus haut, puis elle circule de bac en bac sous l'action de la pesanteur pour finir par être récupérée au fond dans une jatte de collecte équipée d'une pompe électrique qui assure à nouveau l'alimentation des bacs supérieurs en solution nutritive.

### **Préparation de la solution nutritive**

L'eau du robinet est utilisée pour la préparation des solutions nutritives. Une analyse de l'eau est effectuée pour les ions  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $SO_4^-$ ,  $NO_3^-$  et  $HPO_4^-$ . Elle est corrigée en ajoutant des engrais et oligo-éléments pour obtenir une solution nutritive adoptée pour l'endive selon Leteinturier *et al.*, 1991.

### **Apport d'acide nitrique et contrôle quotidien**

L'acide nitrique était additionné à la solution nutritive pour réduire le pH et pour assurer la concentration requise de nitrate pour N1, N2 et N3. Les solutions nutritives étaient renouvelées tous les trois jours pour éviter l'accumulation de sels nocifs et pour réduire les risques d'attaques fongiques. Des observations et des corrections quotidiennes étaient effectuées pour le pH, la conductivité électrique et la température à l'aide d'un pH mètre, d'un conductimètre et d'un thermohydrographe.

### **Analyse des différents paramètres**

Les chicons ont atteint la maturité après 19 jours de forçage. Ils sont séparés des racines et mesurés pour les différents paramètres de qualité notamment le poids et le diamètre des racines; le poids des radicules; le poids, la longueur et le diamètre des chicons. Ensuite une analyse foliaire des nitrates était réalisée pour tous les traitements. Les résultats ont subi les analyses statistiques sur EXCEL. L'analyse du DMRT (Duncan's Multiple Range Test) est appliquée selon Gomez et Gomez, 1984.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Variations du pH et de la Conductivité Electrique

Pour les deux solutions N1 et N2, le pH était stable. Il a varié entre 5.2 et 7 conformément à ce qui est recommandé (Leteinturier *et al.*, 1991). Tandis que pour N3, le pH était très bas à cause de la haute concentration d'acide nitrique utilisée pour augmenter la concentration du nitrate dans cette solution. Ainsi suite à l'observation d'un retard de croissance pour N3, la quantité totale de  $\text{NO}_3$  a été apportée à parts égales sous forme d'acide nitrique (1/3), de nitrate de calcium (1/3) et de nitrate d'ammonium (1/3); ce qui a ramené le pH à la marge acceptable tout en augmentant légèrement le taux de calcium et d'ammonium.

Concernant la conductivité électrique, elle a fluctué entre 2 et 3 mS/cm pour N1 et N2, tandis que pour N3, elle a dépassé la limite maximale de 3 mS/cm, ce qui a affecté le rendement de N3.

### Variations du diamètre et du poids des racines dans les trois solutions nutritives

Le diamètre des racines a varié de 3.72 cm à 3.62 cm pour D1 avec une moyenne de  $3.67 \pm 0.05$  cm et de 2.87 cm à 2.76 cm pour D2 avec une moyenne de  $2.8 \pm 0.06$  cm (Figure 1).

L'analyse du DMRT a montré que les différentes moyennes présentent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre D1 et D2 alors que la différence n'est pas significative au sein de chacun des deux diamètres D1 et D2. L'analyse de la variance a montré un coefficient de variation très acceptable de 3.14%.

Concernant le poids des racines, il a varié de 99.02 g à 87.04 g pour D1 avec une moyenne de  $92.45 \pm 6.07$  cm et de 54.17 g à 51.79 g pour D2 avec une moyenne de  $53.37 \pm 1.36$  cm (Figure2).

L'analyse du DMRT a montré, pour D1, une différence significative dans N1 par rapport à N2 et N3 ( $p < 0,05$ ). Pour D2, pas de différence significative entre les trois traitements. Le coefficient de variation étant de 8.6%.

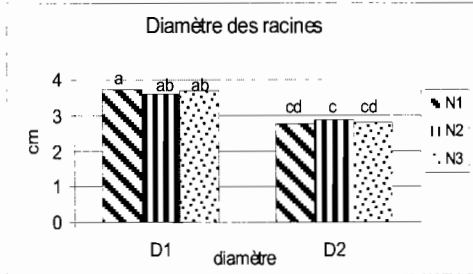


Fig. 1: Variations du diamètre des racines dans les trois solutions nutritives.  
a,b,c, et d =  $P < 0.05$

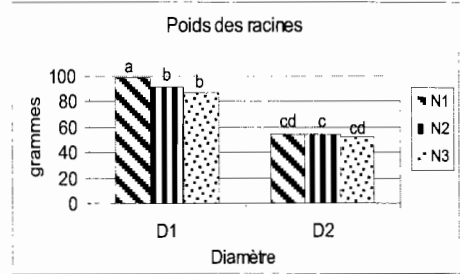
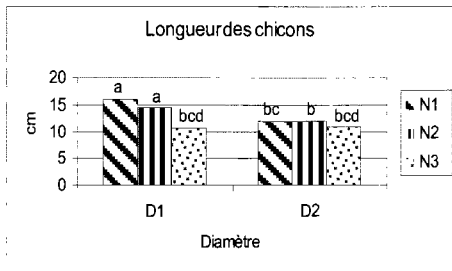


Fig. 1: Variations du poids des racines dans les trois solutions nutritives.  
a,b,c, et d =  $P < 0.05$

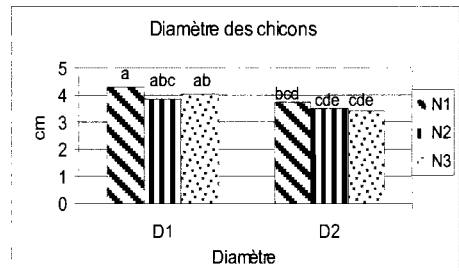
### Variations de la longueur et du diamètre des chicons dans les trois solutions nutritives

La longueur des chicons a varié de 16.05 cm à 10.73 cm pour D1 et de 11.87 cm à 10.85 cm pour D2 avec une moyenne de  $13.76 \pm 2.73$  cm pour D1 et de  $11.53 \pm 0.58$  cm pour D2 (Figure 3). L'analyse de la variance a montré une différence significative ( $p < 0,01$ ) entre les traitements. L'analyse du DMRT a montré dans D1 une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre N1 et N2 d'une part et N3 d'autre part. Pour D2, la différence n'est pas significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois moyennes. Le coefficient de variation étant de 9.05 %. La longueur des chicons, comprise entre 10 et 16 cm, les classe dans la catégorie Extra (Leteinturier *et al.*, 1991).

Par rapport au diamètre des chicons, il a varié de 4.32 cm à 3.83 cm pour D1 et de 3.74 cm à 3.4 cm pour D2 avec une moyenne de  $4.07 \pm 0.24$  cm pour D1 et de  $3.54 \pm 0.17$  cm pour D2 (Figure 4). L'analyse de la variance a montré une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les traitements. L'analyse du DMRT a montré une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les traitements éloignés. Les résultats ont été comparables à ceux du poids des chicons sauf pour N3D1 qui présente un diamètre de chicon supérieur à celui de N2D1 accompagné d'une longueur de chicon relativement très courte, comme si le déficit en longueur a été compensé par une augmentation du diamètre. Une corrélation positive de 88.2% existe entre le poids des racines et le diamètre des chicon. Ceci reflète le rôle important du poids et des réserves de la racine dans l'élaboration des chicons. Ce résultat rejoint les interprétations de Fouldrin et Limami, 1993, et de Millard, 1998, qui ont mis l'accent sur le rôle de l'azote endogène dans la formation du chicon.



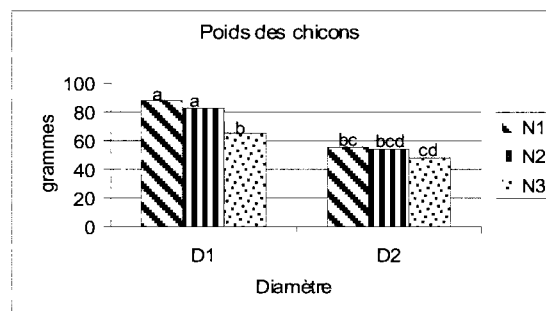
**Fig. 3:** Variations de la longueur des chicons.  
a,b,c,d et e =  $P < 0.05$



**Fig. 4:** Variations du diamètre des chicons.  
a,b,c,d et e =  $P < 0.05$

### Variations du poids des chicons dans les trois solutions nutritives

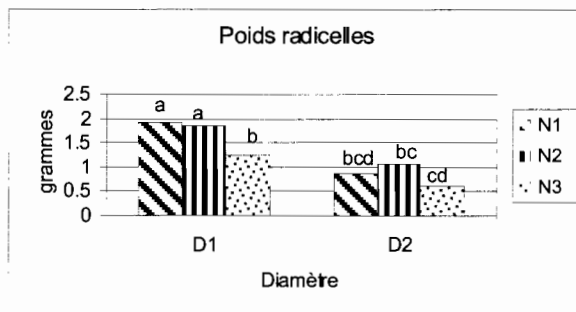
Le poids des chicons a varié de 87.56 g à 65 g pour D1 et de 56.02 g à 47.65 g pour D2 avec une moyenne de  $78.40 \pm 11.88$  g pour D1 et de  $52.58 \pm 4.38$  g pour D2 (Figure 5). L'analyse de la variance a montré une différence significative ( $p < 0,01$ ) entre les traitements. L'analyse du DMRT pour D1 a montré une différence significative entre d'une part N1 et N2 et N3 d'autre part. Au niveau de D2, la différence n'est pas significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois traitements. Pourtant une différence significative ( $p < 0,05$ ) existe au sein de chaque niveau d'azote entre D1 et D2, ce qui extériorise l'effet du diamètre des racines. Une forte corrélation positive de 93.4% existe entre le poids des chicons et celui des racines ce qui rejoint les travaux de (Fouldrin et Limami, 1984).



**Fig.5:** Variations du poids des chicons.  
a,b,c et d =  $P < 0.05$

### Variations du poids des racicelles dans les trois solutions nutritives

Le poids des racicelles a varié de 1.93 g à 1.25 g pour D1 et de 0.6 g à 1.04 g pour D2, avec une moyenne de  $1.68 \pm 0.37$  g pour D1 et de  $0.83 \pm 0.22$  g pour D2 (Figure 6). Seulement N1D1 et N2D1 ont donné un poids de racicelles conforme aux normes selon (Leteinturier et *al.*, 1991). L'analyse de la variance a montré une différence significative ( $p < 0,01$ ) entre les traitements pourtant avec un coefficient de variation relativement élevé de 22.4 %. L'analyse du DMRT a montré que N1D1 et N2D1 ne présentent pas de différence significative ( $p < 0,05$ ), pourtant ils se différencient nettement par rapport au reste. Au niveau de D2, les traitements n'ont pas bien rentabilisé les solutions nutritives ce qui pourrait être attribué à leur faible diamètre qui réduit la surface de contact de la racine avec la solution nutritive.



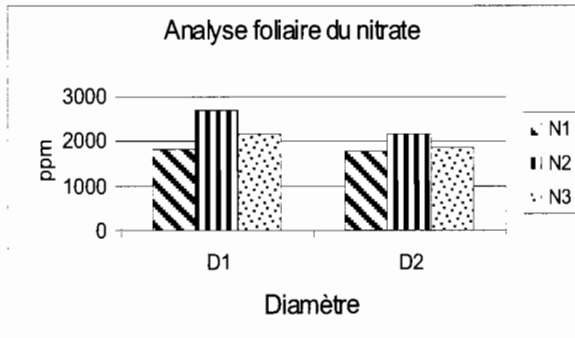
**Fig.6:** Variations du poids des racicelles dans les trois solutions nutritives.

*a, b, c et d = P < 0.05*

### Variation des nitrates foliaires dans les chicons selon les trois solutions nutritives:

Le taux de nitrate foliaire a varié pour D1 de 1810 ppm à 2698.33 ppm et pour D2 de 1778.33 ppm à 2181.67 ppm avec une moyenne de  $2218.89 \pm 448.25$  ppm pour D1 et de  $1939.44 \pm 231.55$  ppm pour D2 (Figure 7). La solution N1 a donné des chicons moins riches en nitrates que ceux de N2, ce qui est logique étant moins concentrée en nitrate. Pour N3, le faible poids de racicelles pourrait expliquer la réduction de l'absorption des nitrates dans les feuilles laquelle s'est située entre N1 et N2 pour les deux diamètres. Tous les traitements ont donné un taux de nitrates inférieur à 3000 ppm limite admissible selon Fritsch et De Saint Blanquat, 1992, qui citent une limite de 4000 mg d'ions nitrate/kg de poids frais.





**Fig.7:** Concentration en nitrate foliaire dans les trois solutions nutritives.

## CONCLUSIONS

L'étude a montré la possibilité de produire des racines forçables en hiver sous-serre ce qui permet d'étendre le calendrier de production. La solution N1 moins riche en nitrate a montré des résultats quantitatifs et qualitatifs meilleurs que ceux obtenus avec la solution recommandée par Leteinturier *et al.*, 1991. La réussite de la culture hydroponique met à la disposition des agriculteurs une nouvelle technique de production de chicons de qualité avec des moyens peu sophistiqués.

**BIBLIOGRAPHIE**

- CHAUX C. et FOURY C., 1994, Productions légumières tome 2, *Agriculture d'aujourd'hui*, Lavoisier, 639 pp.
- FOULDRIN K. and LIMAMI A., 1993, The influence of nitrogen (NO<sub>3</sub>) supply to Chicory (*Cichorium intybus* L.) plants during forcing on the uptake and remobilization of N reserves for chicon growth. *J. Experimental Botany*, Vol. 44, No. 265, pp. 1313-1319.
- FRITSCH P. et de Saint Blanquat G., 1992, Les nitrates et les nitrites: Apports alimentaires et leur devenir, *science des aliments*, 3, 12, HS, pp. 563-578.
- GOMEZ K. and GOMEZ A., 1984, Statistical procedures for agricultural research, *second edition*, An international rice research institute book, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 680 pp.
- LETEINTURIER J., COCHET J-P., MARLE M. et BENIGNI M., 1991, L'endive guide pratique, Ctifl, 271 pp.
- MILLARD P., 1988, The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* 11, 1-8.
- Ministère de l'Agriculture Libanaise, 1996-1997, Exportations et importations d'endive au Liban, 64 pp.

# ESSAI DE MISE EN CULTURE D'ECOTYPES DE CHICORÉE COLLECTÉES DU HAUT BASSIN VERSANT DU FLEUVE DE DAMOUR ET COMPARAISON AVEC QUELQUES VARIÉTÉS CULTIVÉES

J. NOUN et  
N. KADDOUM

Université Saint Esprit Kaslik,  
Faculté des Sciences Agronomiques  
B.P. 446, Jounieh-Liban

## RÉSUMÉ

*Afin de contribuer à la protection de l'agrobiodiversité libanaise et à la valorisation des espèces spontanées négligées et sous-utilisées à travers la promotion de leur usage et leur mise en culture, des expérimentations ont eu lieu sur des chicorées sauvages en vue d'élucider leur diversité génétique et de comparer leurs performances aux variétés cultivées.*

*Dans ce propos, 96 collectes ont été faites dans 14 villages représentant différents agro-écosystèmes du haut bassin versant du fleuve de Damour. De plus, 10 cultivars ont été amenés de différentes régions de cultures au Liban. La préparation du matériel végétal a eu lieu à Majdel Méouche, de l'extraction des graines jusqu'au semis. La plantation a eu lieu sur le terrain expérimental à Jbeil durant la saison d'hiver 2000 sur la côte libanaise. Des paramètres agronomiques et botaniques ont été analysés.*

*L'analyse du rendement a montré un poids de la rosette basale variant entre 313g et 160 g. La hauteur de la plante a varié de 89 cm à 67 cm. Le taux de germination a varié de 82% à 17%. Le poids de 1000 graines a varié entre 1800 mg et 900 mg. les écotypes de Majdel Baana, Bmehray, Majdel Méouche et Ain Dara ont montré des traits agronomiques qui pourraient intéresser les*

*sélectionneurs. L'identification morphologique a ressorti quatre phénotypes et un sous phénotype suscitant l'intérêt d'établir une classification inter et surtout intraspécifique du genre Cichorium.*

**Mots clés:** *Cichorium intybus L., agrobiodiversité, germination, domestication, identification, morphologie, rendement.*

## INTRODUCTION

La chicorée étant parmi les herbes les plus communément collectées (Damania *et al.*, 1997) et considérée comme une plante médicinale à effets diurétiques, antiasthmatique et anti-inflammatoire (Yahoo, 2000), plusieurs auteurs (Bianco *et al.*, 1989 ; Abbas *et al.*, 1992 ; Price *et al.*, 1990 ; etc.) y ont effectué des recherches et des expérimentations sur les variétés cultivées. Dans le cadre de l'étude sur la diversité génétique des espèces négligées et sous utilisées, des collectes de la chicorée spontanée ont été ainsi cultivées, les mêmes pratiques culturelles ont été adoptées, des paramètres botaniques et agro-économiques ont été analysés. A la fin de l'expérience, quelques écotypes performants ont été proposés aux sélectionneurs afin d'améliorer leur productivité...

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La zone d'étude, de 100 km<sup>2</sup> de surface, occupe la partie supérieure du bassin versant du fleuve de Damour sur les pentes occidentales du Mont-Liban présentant une multitude de microclimats et une notable richesse en biodiversité. Elle a fait l'objet d'un échantillonnage de villages sur des critères écologiques. Par la suite, durant la saison été-automne 99, les diaspores ont été collectées dans des sacs. En même temps, 10 cultivars (graines et plants à partir de cultures déjà lancées) ont été emmenés de différentes régions de culture surtout de la côte libanaise. La préparation du matériel végétal a eu lieu à Majdel Méouche, village dans la zone d'étude et la culture dans le terrain expérimental de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'USEK à Jbeil.

### **Extraction des graines et semis:**

Vu la dureté des capitules florifères, elle a d'abord commencé en écrasant au pied les plantes sèches collectées dans des sacs en jute, ensuite par broyage

manuel entre deux parpaings de 20x20x40cm<sup>3</sup> puis par tamisage et enfin par vannage. Les graines résultant de l'extraction sont semées en novembre en pépinière comprenant au total 106 caisses de polystyrène à raison d'une caisse de 750 cm<sup>2</sup> par collecte. Elles ont été couvertes d'un film de polyéthylène accélérant le processus de germination. Un mélange de 1/3 sable + 1/3 terreau + 1/3 tourbe est utilisé.

### **Préparation des parcelles expérimentales :**

Elle a commencé par un premier labour en octobre avec une charrue à trois socs, suivi par un second à l'aide d'une moto-bêche afin d'ameublir le sol. La méthode « *Randomized complete block* » (RCB) est utilisée pour des raisons d'hétérogénéité du terrain due au terrassement. Ainsi, 3 blocs, représentant 3 répétitions, sont disposés perpendiculairement au gradient d'hétérogénéité, chacun contenant 106 plots. Chaque plot contient 40 plantes (5 rangées, 8 plantes chacune) soit 120 plantes pour les 3 répétitions. Les distances de plantation sont de 20 cm sur la ligne, et 30 cm entre les lignes. Le nombre total de plantes est alors 12480 couvrant une surface cultivée de 750 m<sup>2</sup> avec une densité de 16.6 plantes/m<sup>2</sup> cultivé.

### **Transplantation :**

Elle a eu lieu un mois après le semis, au stade de 3 à 5 feuilles. Etant donné que la plantation a eu lieu pendant la saison pluvieuse et à cause de la texture argileuse du terrain et vu le besoin d'un espacement régulier plus ou moins précis entre les plantules et les rangées, quatre grandes planches en bois ont servi de support pour, d'une part, assurer l'espacement requis entre les plantes à l'intérieur de la rangée et entre les rangées elles-mêmes, et d'autre part, supporter le personnel qui plante pour éviter le piétinement des parcelles.

### **Entretien de la culture :**

- La lutte contre les mauvaises herbes est faite manuellement en deux passages.
- La fertilisation est assurée en cours de culture, à travers un apport de fumure organique de volaille effectué en début de culture à raison de 2500 l/dn, et deux applications de nitrate d'ammonium (33,5%), en cours de culture sous la pluie, totalisant 40 U/dn.
- Aucun traitement phytosanitaire d'insecticide, acaricide ou fongicide n'a été nécessaire.

## **Analyse des paramètres agronomiques et botaniques :**

### **Le poids de la rosette basale:**

Dans chaque plot, 4 plantes ont été sélectionnées parmi les 40 individus plantés. Elles ont été coupées jusqu'au collet et mises dans des sacs pour la pesée sur une balance digitale. Les données obtenues ont été enregistrées et analysées sur le programme Excel.

### **La hauteur moyenne de la plante:**

Après floraison, la mesure de la hauteur des plantes a été réalisée, du collet jusqu'au bout de la tige, à l'aide d'une longue règle. Une moyenne de 4 plantes par plot est également adoptée.

Les analyses statistiques sur Excel ont porté sur ANOVA ou Analyse de la variance selon la méthode de Gomez et Gomez, 1984.

### **Le rapport périmètre/surface foliaire :**

4 plantes sont choisies, 2 feuilles par plante sont arrachées manuellement. Les 24 feuilles (des trois répétitions), ont été rangées sur une feuille A0 et photographiées par l'intermédiaire d'une caméra digitale. Les photos obtenues sur l'ordinateur, ont subi l'analyse fractale (Fractal Analysis) sur un logiciel appelé Benoit 1.3 proposé par l'IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). Il permet d'établir une relation linéaire entre le périmètre et la surface suite à une transformation logarithmique.

### **La classification morphologique:**

Elle est faite après floraison basée sur des critères morphologiques discriminants, suite à la consultation de Mouterde (1983), et Dinsmore et Post (1933). 4 phénotypes (I, II, III et IV) et un sous phénotype (Ip) ont été ressortis.

### **Le poids de 1000 graines:**

Un échantillonnage de 18 lots comprenant 14 écotypes et 4 cultivars est fait à partir des 106 collectes initiales. 100 graines par collecte ont été pesées à deux reprises, décalées de 3 mois, à l'aide d'une balance de précision.

### **Le test de germination :**

Il est fait selon la méthode recommandée par l'IBPGR (*International Board For Plant Genetic Resources*) Advisory Committee on Seed (1985). 100 graines par collecte ont été semées en deux répétitions dans des boîtes de pétri.

Des observations quotidiennes sont faites avec suivi de la température à l'aide d'un thermographe. La germination a été notée à partir du cinquième jour.

### Les analyses statistiques :

Elles ont été faites sur Excel pour l'analyse de la variance et les autres analyses classiques et sur Benoit 1.3 pour l'analyse fractale.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Poids de la rosette basale :

Le cultivar de « Ammiq cultivé » a montré la plus grande moyenne de poids de la rosette basale foliaire de 313 g (fig. 1), pas très éloigné de l'écotype Majdel Baana (295 g) tandis que l'écotype de « Aghmid » a montré la plus faible moyenne de 160 g.

L'analyse de la variance a montré une différence hautement significative entre les différents traitements.

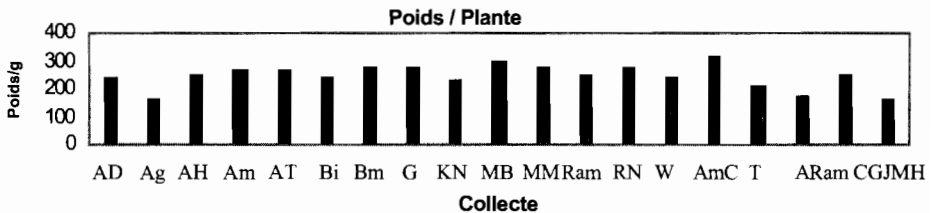


Fig. 1: Poids moyen des plantes

AD=Ain Dara ; Ag=Aghmid ; AH=Ain-el-halazoun ; Am=Ammiq ; AT=Ain trez ; Bi=Bireh ; Bm= Bmehray ; G=Geayel ; KN=Kfarnabrakh ; MB=Majdel Baana ; MM=Majdel Méouche ; Ram=Ramlieh ; RN=Rouisset-el-Neeman ; W=Warhanieh ; AmC=Ammiq Cultivé ; T=Tripoli ; A=Akkar ; RamC=Ramlieh Cultivé ; CGJM=Chouwaifat + Gieh + Jbeil + MajdelMéouche cultivé + Hadath.

### Hauteur moyenne des plantes :

« Ramlieh cultivé » a montré la plus grande moyenne de 89 cm (fig. 2), pas très éloigné de l'écotype « Bmehray » (81 cm) tandis que l'écotype de « Ain Trez » a montré la plus faible moyenne de 67 cm.

L'analyse de la variance a montré une différence significative entre les différents traitements.

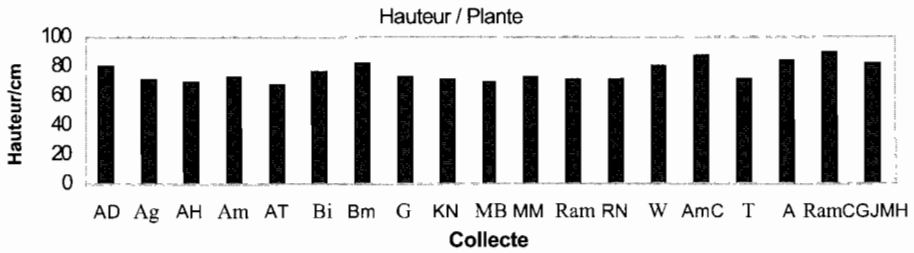


Fig. 2: Hauteur moyenne des plantes (Abréviations cf. fig. 1)

### Poids de 1000 graines:

« Ramlich Cultivé » a montré la plus grande moyenne de 1800 mg (fig. 3), rattaché de l'écotype « Ain Dara » 1552 mg et l'écotype « Aghmid » la plus faible moyenne de 900 mg.

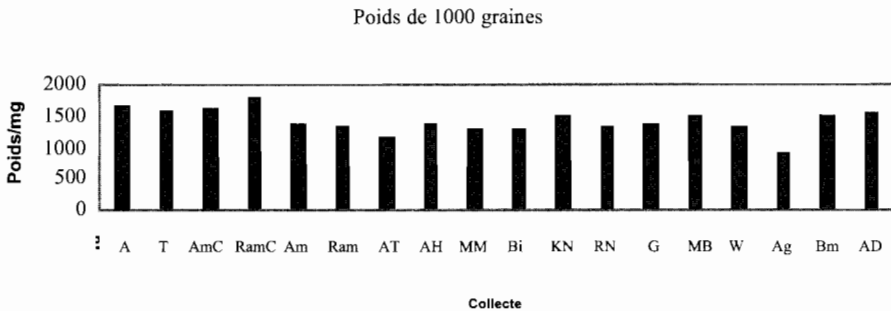


Fig. 3: le poids de 1000 graines par village (Abréviations cf. fig. 1).

### Test de germination :

**Somme de température exigée:** Les observations effectuées sur le thermographe ont montré un besoin de 109.5 degrés-jours.

**Taux de germination :** Le taux moyen de germination des graines a varié en moyenne entre 17% pour l'écotype de « Warhanieh » et 82 % pour le cultivar de « Tripoli ». Parmi les écotypes, Majdel Méouche a montré le taux le plus élevé (66%).



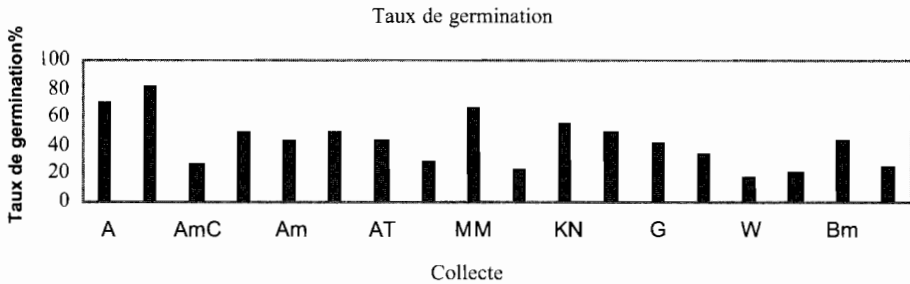


Fig. 4: Taux de germination des graines (Abréviations cf. fig. 1)

### Analyse du rapport Périmètre/Surface foliaire:

La segmentation foliaire a montré une variabilité entre les écotypes, facteur utilisé plus tard dans la classification.

### Classification morphologique:

Après floraison, l'observation morphologique des collectes a montré quatre grands phénotypes et un sous phénotype (tab.1). D'un autre côté, nombreuses références citent *Cichorium intybus* L. comme ancêtre des chicorées cultivées et la décrivent en tant que plante vivace dans la flore libanaise. L'identification morphologique a montré une appartenance des collectes à *intybus*. Pourtant, lors du travail de terrain, et d'après le comportement de la plante, elle s'est montrée annuelle au niveau de toutes les collectes, ce qui laisse penser à « *pumilum* », la seule chicorée annuelle spontanée décrite au Liban (Mouterde, 1983; Dinsmore et Post, 1933). La variété de Tripoli a été très éloignée des écotypes sauvages notamment en terme de forme de feuille (leaf shape), inflorescence, port, ramification, etc. Les autres variétés cultivées ont été proches du phénotype I. D'autre part, parmi les collectes sauvages, le phénotype IV (Aghmid) s'écarte nettement à la fois des variétés cultivées et des autres types sauvages notamment en terme de chorologie, de poids de la rosette basale, forme de la segmentation foliaire, poilure, degré de ramification et poids de 1000 graines.

**Tab. 1:** Différentes caractéristiques des quatre phénotypes et du sous phénotype

	<b>Sol</b>	<b>Hauteur</b>	<b>% des collectes</b>	<b>Rapport aigrette/akène</b>	<b>Ramification</b>
<b>Phénotype I</b>	Calcaire	73 cm	56.6	1/8	Divariquée
<b>Phénotype Ip</b>	Calcaire	71 cm	29.2	1/8	Divariquée et poilue
<b>Phénotype II</b>	_	83 cm	0.95	1/4 - 1/6	Verticale dressée
<b>Phénotype III</b>	_	83 cm	8.5	1/4 - /6	Ramifiée
<b>Phénotype IV</b>	Sableux	71 cm	4.75	1/8	Ramifiée

## CONCLUSION

L'étude effectuée a permis d'évaluer le potentiel agronomique et la diversité génétique de *Cichorium* et de donner les premiers éléments d'affinités probables entre les écotypes et les variétés cultivées. Elle a montré une réussite de la domestication des collectes sauvages notamment en ce qui concerne la germination, la réponse positive à la fumure et aux autres pratiques culturales ce qui constitue un aspect prometteur surtout avec un rendement moyen de 4 tonnes/dunom/coupe.

Quatre écotypes pourraient être proposés aux sélectionneurs notamment pour le poids de la rosette basale (Majdel Baana), pour la hauteur de la plante (Bmehray), pour le poids de 1000 graines (Ain Dara) et pour le taux de germination (Majdel Méouche).

A une autre échelle, la zone d'étude a montré une diversité génétique assez riche reflétant la nécessité d'établir une classification inter et intra spécifique surtout pour trancher à propos de la confusion entre *intybus* et *pumilum*. Dans le même cadre, le type Aghmid ne présente aucun intérêt agronomique vu le poids de sa rosette basale, cependant, il mérite une attention particulière en terme de diversité génétique étant écarté à la fois des collectes sauvages et cultivées.

## RÉFÉRENCES

Abbas, Jameel A., Ahmed A., El Oqlah, and Adel M. Mahasneh, 1992. Herbal plants in the Traditional Medicine of Bahrain, economic botany 46(2):158-163.

Bianco, V.V. and Santamaria, P. and Elia, A., 1998. Nutritional value and nitrate content in edible wild species used in Southern Italy. Proc. 3<sup>rd</sup> IS on Diverification of vegetable crops. Eds. V.E. Rubatzky, chen hang, J.Y.Péron, Acta Hort. 467, ISHS. P.71-75.

Benoit 1.3. Copyright © TruSoft Int'l Inc. 1997-1999. All Rights Reserved.

DAMANIA A. B., VALKOUM J., WILLCOX G. and QUALSET C. O., 1997. The origins of agriculture and crop domestication. The Harlan symposium, 352 pp.

DINSMORE and POST E., 1933. Flora of Palestine, Syria and Sinai. 824 pp.

GOMEZ, K., GOMEZ, A., 1984. Statistical procedures for agricultural research. Second Edition. An international rice research institute book, New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, 680 pp.

IBPGR (*International Board for Plant Genetic Resources*) Advisory Committee on Seed (1985).

MOUTERDE, P., 1983. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie, Tome Troisième, Atlas, Beyrouth. 900 pp.

YAHOO, 2000. <http://www.chicorybenefits.com/>

## MÉTABOLISME DU GLUTATHION DANS LE GRAIN DE BLÉ TENDRE

G. FADEL<sup>1</sup> et T. AUSSENAC<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Saint Esprit de  
Kaslik-Liban, Faculté des Sciences  
Agronomiques. B.P. 446 Jounieh-Liban.

<sup>2</sup> Ecole Supérieure d'Agriculture Purpan,  
Laboratoire d'Agrophysiologie Toulouse-France.

E-mail : [aussenac@esa-purpan.fr](mailto:aussenac@esa-purpan.fr).

### RÉSUMÉ

*Le blé se caractérise des autres céréales, par sa capacité d'être panifié, grâce à la présence du gluten dans sa farine. De nombreuses études ont montré l'importance des polymères gluténines et surtout la fraction gluténique insoluble (Fi) au Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 2% dans l'acquisition de la valeur boulangère.*

*Le glutathion est un tripeptide ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine). Il est le thiol le plus fréquent dans la plante et fait un équilibre d'oxydo-réduction pour protéger les protéines contre l'oxydation irréversible causée par les stress (déshydratation).*

*Dans le but de mieux comprendre le phénomène de polymérisation des protéines, une méthode d'analyse chromatographique (HPLC) a été utilisée pour doser le glutathion libre réduit (GSH), le glutathion libre oxydé (GSSG) et le glutathion lié aux protéines (GSSP). Cette analyse a été réalisée depuis le stade 8 jours après floraison (JAF) jusqu'au stade 51 jours après floraison sur la variété française « Soissons » de blé tendre, en 1999, dans le laboratoire d'agro-physiologie végétal de l'ESAP-France.*

*Le rapport GSH/GSSG a diminué clairement durant la phase d'élongation cellulaire (16-30 JAF), ce qui témoigne d'un phénomène d'oxydation. Le glutathion lié aux polymères gluténiques (PSSG) est apparu significativement*

*au début de la phase de maturation du grain (au-delà de 28 JAF), date d'apparition de la fraction gluténiques insoluble au SDS 2% (Fi). Cette liaison entre les polymères gluténiques et le GSSG s'est traduit par une augmentation du rapport PSSG/GSH total. Les résultats obtenus ont montré l'intervention des thiols dans la polymérisation des gluténines.*

## INTRODUCTION

Depuis l'antiquité et jusqu'à nos jours, le blé a occupé la première place mondiale dans l'alimentation grâce à sa haute valeur énergétique (Clavel, 1990) et à ses propriétés panifiables. Ces propriétés sont représentées par la capacité de la farine à donner des pâtes capables de se développer en retenant le gaz carbonique dégagé durant la fermentation pour donner du beau et du bon pain.

Ses valeurs boulangères sont liées à la présence du gluten qui forme durant le pétrissage un réseau viscoélastique unique dans le règne végétal. Le gluten est un composé macromoléculaire complexe formé de 75% de protéines de réserve (gliadines et gluténines), de 5 à 7% de lipides, de 5 à 8 % d'eau (Finney, 1943) et d'amidon qui est peu impliqué dans la qualité boulangère (Eliasson et Tjerneld, 1990). Ce sont les protéines du gluten qui s'associent entre elles et évoluent au cours du pétrissage pour conférer à la pâte ses propriétés technologiques. En effet, dans la littérature, beaucoup des chercheurs ont mis en évidence la relation entre la quantité de polymères protéiques et la qualité technologique (Hubner et Wall, 1976 ; Field *et al.*, 1983 ; Dachkevitch et Autran, 1989 ; Singh *et al.*, 1990 ; Carceller et Aussenac, 1999). La qualité et la quantité des protéines influencent donc la valeur boulangère (Finney et Baramore, 1948 ; Jia, 1995).

La qualité technologique est plus particulièrement en relation avec la quantité des protéines insoluble au SDS 2% (Fi) (Kurowska et Bushuk, 1988 ; Gupta *et al.*, 1993 ; Jia 1995 ; Carceller et Aussenac, 1999).

La qualité boulangère montre parfois une variabilité d'une année sur l'autre et d'une région à l'autre. Ceci rend difficile les transformations automatisées de farine. Ainsi, les variations des conditions climatiques durant la maturation modifient l'accumulation des protéines et leur cinétique d'agrégation (Kasarda, 1989 ; Randall et Moss, 1990). De même, Jia (1995) a montré que la nature du génotype et les facteurs pédoclimatiques agissent sur le mode de polymérisation des gluténines ainsi que sur les propriétés rhéologiques de la farine. Une des

hypothèses qui peut être faite pour expliquer ces variations de polymérisation réside dans le fait que des groupements thiols libres, comme le glutathion présente dans le grain de blé, modifient l'association des polymères protéiques entre eux.

L'objectif de cette étude était de mettre au point un protocole de quantification et de séparation des différentes formes de glutathion (GSH, GSSG et PSSG) dans le grain de blé tendre au cours de son développement et de sa maturation. Ce travail a donné l'occasion de tester à la fois des techniques enzymatiques (glutathion transférase notamment) ainsi que des techniques chromatographiques (HPLC). On se limite au cours de la présente investigation à la description de la technique chromatographique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

La variété de blé utilisée dans cette étude est Soissons (Glu-D1 sous unités 5+ 10). Cette variété a été cultivée à la ferme de l'ESAP Toulouse-France durant l'année 1998. Les échantillons ont été prélevés au hasard sur une parcelle de 900 m<sup>2</sup>. Le premier jour de floraison chaque épi a été bagué et daté. Tous les deux jours, 50 épis ont été récoltés du 8<sup>ème</sup> jour après floraison jusqu'à la maturité totale (51 jours après floraison). Le poids frais de 50 grains a été mesuré, puis ils ont été séchés à 80°C jusqu'à un poids stable. Le poids sec de 50 grains a été mesuré. La différence entre les deux poids donne la quantité d'eau contenue en mg dans 1000 grains.

Pour le dosage du glutathion, les grains sont lyophilisés et conservés à -20°C et broyés (Broyeur IKA LABORTECHNIK STAUFEN de laboratoire Janke et Kunkel GmbH et CO. kg).

L'appareil chromatographique est du type Thermo Separation Products, muni d'une pompe P 4000, d'un dégazeur SCM 400, d'un passeur automatique d'échantillon AS3000 et d'un détecteur UV 2000.

Le glutathion a été dosé par une méthode chromatographique liquide de haute performance (HPLC) (Schofield et Chen, 1995). Cette méthode, facile et rapide, permet de séparer et de quantifier les différentes formes de glutathion (GSH et GSSG) en une seule étape. Elle est basée sur la formation de dérivé S-

Carboxymethyl à partir des groupements thiols libres par alkylation avec l'acide iodo-acétique suivie d'une dinitrophénylation des fonctions aminées par le 1-Fluoro-2,4 dinitrobenzène (FDNB). Après dérivatisation, les produits sont séparés par une colonne amine (Spherisorb NH de porosité 5  $\mu$ m de longueur 250 mm et de diamètre 4.6 mm) et détectés en UV 365 nm (Schofield et Chen 1995 ; Fariss et Reed 1987).

### **Solvant de l'HPLC**

Solvant A : méthanol /eau déminéralisée 4/1 (v/v).

Solvant B : 272g de sodium acétate trihydrate.

122ml d'eau.

378ml d'acide acétique glacial (soit 396,9g).

Un volume de 200ml de cette solution a été diluée dans 800ml de la solution A pour obtenir le solvant B (Schofield et Chen-1995).

Le méthanol est utilisé pour éluer rapidement l'excès de N-2,4 dinitrophenol (DNP) des acides aminés neutres et acides et l'excès de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (Reed *et al.*, 1980). L'acide acétique maintient quant à lui les groupes aminés de la phase stationnaire sous forme positive pour permettre une bonne sélection des dérivés DNP acides en augmentant la concentration du sodium et d'acétate d'ammonium (Reed *et al.*, 1980). Après l'injection de 100  $\mu$ l de l'échantillon et pendant 10 minutes, le gradient est de 85% de solvant A et 15% de solvant B. Ensuite, un gradient linéaire est appliqué en faisant varier la proportion du solvant B de 15% à 100% en 15 minutes. Après 3 minutes d'élution avec 100% de solvant B, les conditions initiales sont obtenues en 2 minutes et stabilisées pendant 17 minutes. (Schofield et Chen-1995). Dans ces conditions d'analyse le temps de rétention est de minutes pour le GSH et de minutes pour le GSSG

### **Méthode d'extraction du glutathion libre dans la farine**

Un volume de 2 ml d'acide perchlorique (Chen et Schofield 1995) (Reed *et al.*, 1980) est ajouté à 0,2 g de farine dans un tube de Téflon de 10 ml. L'extraction a duré 1h à 4°C en vortexant toutes les dix minutes. Enfin, les échantillons ont été centrifugés à 26000g, pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contient les formes libres du glutathion (GSH et GSSG) et le culot contient les formes de glutathion liées aux protéines (PSSG).



### **Méthode d'extraction du glutathion lié aux polymères gluténiques**

Le culot, déjà obtenu dans l'extraction précédente est rincé et centrifugé deux fois avec de l'acide perchlorique 5% (v/v) pour le nettoyer de toutes traces de formes libres. L'extraction des polymères gluténiques se fait pendant 1h à température ambiante en ajoutant 4 ml de NaI (0,3M) préparé dans du propanol-1 7,5% (v/v) (Fu et Kovacs 1999) et en vortexant toutes les 10 minutes. Les échantillons sont, ensuite, centrifugés à 15900g pendant 10 minutes à température ambiante.

Le culot obtenu est rincé et centrifugé 2 fois avec la solution d'extraction pour éliminer les traces de monomères. 2 ml de tampon phosphate de sodium (0,1M) pH=7,5 contenant 24 mM du réducteur dithioerytreitol (DTE) sont, ensuite, ajoutés pour extraire le glutathion. L'extraction s'effectue durant 1h à 60°C en vortexant toutes les dix minutes. Les échantillons sont, ensuite, refroidis à 4°C pendant 10 minutes, et 154µl d'acide perchlorique 70% (v/v) (à 4°C) ont été ajoutés pour précipiter les protéines. Enfin les échantillons sont centrifugés à 26000g pendant 15 minutes à 4°C (Schofield et Chen, 1995).

Le surnageant obtenu contient le glutathion qui était lié aux polymères gluténiques (GSSP).

### **Alkylation et dérivation du glutathion**

Un volume de 1 ml de surnageant déjà obtenu est ajouté dans un tube contenant :

0,09g de bicarbonate de sodium, 100µl de 3- [N- morpholino] propanesulfonic acide (MOPS) 0,05M pH 8,5 et 100µl d'acide iodoacétique (IAA) 0,01M.

Les échantillons subissent alors une incubation pendant 1h à 40°C sous agitation à l'obscurité. Puis, 500µl de cet échantillon sont recueillis dans un tube eppendorf et sont ajoutés à 500µl de FDNB 1% (v/v) dans l'éthanol absolu. Les échantillons sont incubés pendant 4h à 40°C à l'obscurité et centrifugés à 7000g à 20°C pendant 10 minutes. Enfin, les échantillons sont filtrés (0,45µm) et injectés en HPLC pour l'analyse qualitative et quantitative.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin de valider la méthode de quantification des formes GSH et GSSG par la technique HPLC, plusieurs gammes d'étalonnage ont été réalisées à partir de mélanges standards préparés en solution avec de l'acide perchlorique.

Quelque soit la forme de glutathion utilisée (forme réduite et/ou oxydée), les réponses obtenues (exprimées en surface de pic chromatographique) sont totalement linéaires et ceci pour une gamme de concentration comprise entre 0 et 5 nmol/ml et 0 et 20 nm/ml de GSSG et GSH respectivement. De plus, les différents coefficients de corrélation ( $r^2$ ) sont hautement significatifs (probabilité < 0,01). Ces résultats démontrent donc la faisabilité complète de cette technique ainsi que son haut niveau de sensibilité. En tout état de cause, cette méthodologie HPLC répond parfaitement aux objectifs poursuivis.

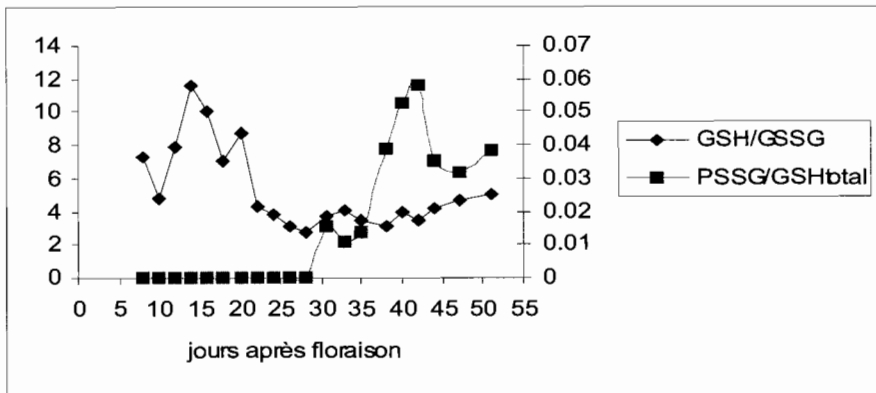
### **Accumulation des différentes formes de glutathion**

Les résultats ont montré que les formes libres du glutathion subissent, dans le même temps, d'importantes évolutions au cours de toutes les phases de développement du grain. Ainsi, le glutathion réduit (GSH), qui représente la forme majoritaire quelque soit le stade physiologique, voit sa quantité évoluer de 3 nmol/grain à 20 nmol/grain au cours des étapes de remplissage du grain (phases de division d'élongation cellulaire : 0-33 JAF). De la même façon, le glutathion oxydé (GSSG) voit sa quantité évoluer de 0,5 nmol/grain à 5 nmol/grain. Ces évolutions traduisent une très forte accumulation des formes libres du glutathion durant la croissance du grain. Ces observations sont en accord avec le métabolisme de l'azote et du soufre. Contrairement aux formes libres, le glutathion lié aux polymères gluténiques n'apparaît significativement qu'au-delà de la phase d'élongation cellulaire (au-delà de 28 JAF).

La figure 2 montre clairement que le rapport GSH/GSSG évolue beaucoup notamment durant la phase d'élongation cellulaire (16-30 JAF). En effet, quelques

jours après la floraison, le GSH représente la forme majoritaire des formes libres alors qu'au-delà de 16 JAF, sa présence relative diminue au profit de GSSG. Ces résultats témoignent donc d'un phénomène d'oxydation au sein même des cellules de l'albumen du grain au cours de la phase d'élongation cellulaire. N'ayant pas étudié lors de ce travail les différentes activités enzymatiques responsables du métabolisme du glutathion, il est toutefois difficile de statuer sur l'origine précise de ce phénomène : s'agit-il d'une

réduction de l'activité de la glutathion réductase (GR) limitant la conversion enzymatique du GSSG en GSH ou d'une augmentation de l'activité glutathion peroxydase (GP) accélérant la conversion enzymatique du GSH en GSSG ? Une étude métabolique plus fine devrait permettre de répondre ultérieurement à cette question.



**Fig. 2:** comparaison entre le rapport GSH/GSSG et le rapport PSSG/GSHtotal. Cette figure montre que l'apparition de PSSG intervient dans le même temps que le rapport GSH/GSSG atteint sa valeur minimale.

La figure 2 présente encore l'évolution du rapport PSSG/glutathion total. Ce rapport permet de suivre l'évolution de la fixation du glutathion aux niveaux des polymères gluténiques à partir du pool de glutathion libre. Une fois de plus, ces résultats démontrent une fixation tardive de glutathion sur les polymères gluténiques du grain au cours de la phase de déshydratation (après 30 JAF). Il est intéressant de remarquer que l'apparition de formes liées de glutathion intervient alors que dans le même temps le rapport GSH/GSSG aux niveaux des formes libres atteint sa valeur minimale (fig.2). Ces observations tendent à confirmer l'hypothèse de la littérature (Kranner and Gill, 1996) selon laquelle au cours d'un phénomène de déshydratation de tissus végétaux le glutathion réduit (GSH) est oxydé enzymatiquement via l'activité glutathion peroxydase (GP) pour donner le glutathion oxydé (GSSG) lequel se fixe aux protéines par réaction d'échange (SH-SS). Dans cette hypothèse, la forme libre oxydée (GSSG) ne représente qu'un intermédiaire métabolique transitoire et donc par conséquent n'est pas accumulé.

## CONCLUSION

Ce travail a permis de démontrer l'inadaptation des approches enzymatiques en raison notamment des problèmes liés à l'emploi de solutions acides lors des extractions. A l'inverse, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) a permis d'atteindre une dimension qualitative ainsi que quantitative à partir d'échantillons de blé. Même si, quelques progrès doivent être réalisés afin de réduire notamment la variabilité des résultats obtenus, cette technique a permis d'atteindre l'objectif de départ.

Ainsi, l'étude a mis en évidence plusieurs phénomènes : L'accumulation des formes libres du glutathion (GSH et GSSG) subit de profondes modifications au cours des phases de division et d'élongation cellulaire. Ces modifications se traduisant par la baisse du rapport GSH/GSSG au cours de ces phases de croissance et témoignant d'un phénomène d'oxydation au niveau cellulaire. Au cours de la phase de maturation du grain (déshydratation) un certain nombre de liaisons apparaissent entre les polymères gluténiques et le GSSG accumulé se traduisant par une augmentation du rapport PSSG/GSH total. Enfin, il apparaît que la perte en eau du grain au cours de la phase de maturation initie la formation de ces liaisons polymères-GSSG par réaction d'échange de groupements sulfhydryls.

L'ensemble de ces résultats originaux mènent à penser que le glutathion joue un rôle déterminant pour le contrôle de l'insolubilisation des gluténines du grain. En effet, la fixation de la forme oxydée du glutathion (GSSG) sur les polymères gluténiques en cours de la déshydratation du grain limite théoriquement ce phénomène d'insolubilisation. Or, ce dernier est capital pour l'acquisition de propriétés technologiques de la farine du blé. Même si beaucoup de travaux restent à faire, les résultats qui ont été acquis au cours de ces diverses expériences permettent d'ores et déjà de confirmer que le glutathion intervient dans la polymérisation gluténique.

## BIBLIOGRAPHIE

- CARCELLER J. L., AUSSENAC T., 1999. Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in the developing of hexaploid wheats : role of the desiccation phase. *Aus. J. Plant Physiol.*, 26 : 301-310.
- CLAVEL R., 1969. Le pain et la panification. Deuxième édition, France. 125 p.
- DACHKEVITCH T., AUTRAN J. C., 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size- exclusion high performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66: 448-456.
- ELIASSON A. C., TJERNELD E., 1990. Adsorption of wheat protein on Wheat starch granules. *Cereal Chem.*, 67 : 366- 372.
- FARISS M.W., REED D. J., 1987. High performance liquid chromatography of thiols and disulfides : Dinitrophénol Derivatives. *Methods Enzymol.*, 143 : 101-109.
- FIELD J. M., SHEWRY P. R., MIFLIN B. J., 1983. Solubilisation and characterisation of wheat gluten proteins : correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *J. Sci. Food Agri.*, 34 : 370-377.
- FINNEY K. F., 1943. Fractionating and reconstituting techniques as tools in wheat flour research., *Cereal Foods World*, 30 : 794-801.
- FINNEY K. F., BARMORE M. A., 1948. Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chem.*, 25: 291-295.
- FU B. X., KOVACS N. I. P., 1999. Rapid single- step procedure for isolating total glutenin proteins of wheat flours. *J. Cereal Sci.*, 29 : 113-116.
- GUPTA R. B., KHAN K., MacRITCHIE F., 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats.I. Effects of variation in the quality and size distribution of polymeric protein. *J. Cereal Sci.*, 18 : 23-41.
- HUEBNER F. R. et WALL J. S., 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chem.*, 53 : 258-269.
- JIA Y. Q., 1995. Mise en évidence d'une polymérisation différentielle des protéines de réserve chez Soissons, variété de blé tendre (*Aestivum triticum L.*) : approches agronomique, technologique et biochimique. Thèse de doctorat. Toulouse. 115 p.

- KRANNER I., GILL D., 1996. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. *Bot. Acta.*, 109 : 8-14
- KASARDA D. D., 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In *Wheat is unique*. Y. POMERANZ, ed. American Association of Cereal Chemist. St Paul, Minnesota, USA, 277-302.
- KUROWSKA E., BUSHUK W., 1988. Solubility of flour and gluten protein in a solvent of acetic acid, urea, and cetyltrimethylammonium bromide, and its relationship to dough strength. *Cereal Chem.*, 65 : 156-158.
- RANDALL P. J. MOSS H. J., 1990. some effects of temperature regime during grain filling on wheat quality. *Aust. J. Agric. Res.*, 41 : 603-617.
- REED D. J., BABSON J. R., BEATTY P. W., BRODIE A. E., ELLIS W. W., POTTER D. W., 1980. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.*, 106 : 55-62.
- SCHOFIELD J. D., CHEN X., 1995. Analysis of free reduced and free oxidised glutathione in wheat flour. *J. Cereal Sci.*, 21 : 127-136.
- SINGH N. K., DONOVAN R. and MacRITCHIE F., 1990. Use of sonication and size- exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. Tome II. Relative quantity of glutenin as a measure of breadmaking quality. *Cereal Chem.*, 67 : 161-170.