



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : khouiled Nafissa Khadidja

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : Protection des végétaux et de l'environnement

Thème

**Etude de l'état phytosanitaire des semences de
Blé et Maïs et la mise en évidence de leur
Contamination en mycotoxines**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
M.Gouzi.H		Président
Mlle.Ameur D		Examineur
Mme. Touati S		Encadreur

Promotion : Juin-2016



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة عمار ثليجي - الأغواط

كلية/معهد: العلوم
قسم: العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالب (ة): نفيسة خديجة خويلد

ميدان: العلوم الطبيعية والحياة

شعبة: علوم فلاحية

تخصص: حماية نبات وبيئة

موضوع البحث

دراسة الصحة النباتية لبذور القمح والذرة وتسليط
الضوء على تلوثهم بالسموم الفطرية

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم واللقب	الدرجة العلمية	الصفة
هشام قوزي		رئيسا
جميلة عامر		ممتحن أول
سهام التواتي		مشرفا

الدفعة: جوان-2016

Remerciement

Je remercie tout d'abord le bon DIEU qui m'a donné

Le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements en premier lieu à

Mm. Touati sihem, pour avoir encadré et dirigé ce travail

Avec une grande rigueur scientifique,

Pour la confiance qu'elle m'a témoignée depuis le début

Et pour son soutien tout au Long de la réalisation de ce projet.

C'est à la fois un privilège

Et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Mes vifs remerciements s'adressent également

Aux Mmle.Ameur Djamila et M. Gouzi Hicham

D'avoir Acceptés d'examiner ce travail. Mes sincères remerciements

Vont à tous les enseignants qui m'accompagnent durant ma formation.

J'exprime ma reconnaissance à tous mes collègues de

Master Protection de végétaux et l'environnement à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à l'esprit de mon grand-père Mohamed Bourenane

À mes parents,

Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude

Et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

Que DIEU les protège, en témoignage de ma profonde affection.

A mon frère et A mes sœurs

A tous mes collègues et mes amis

A tous ce que j'aime

Sommaire

Résumé	
Dédicace	
Remercîment	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste de l'abréviation	
Introduction	1
Partie I : synthèse bibliographique	
CHAPITRE I : DONNEES SUR LES CEREALES	3
I.1.Importance de la céréaliculture	3
I.2.Le Blé	4
I.2.1.Origine du blé	4
I.2.3.Biologie de la plante	4
I.2.4.Physiologie	4
I.2.5.Le grain du blé	5
I.2.5.1 Composition du grain	5
I.2.6.Cycle de développement du blé	6
a) Stade végétatif	6
b) Stade reproducteur	6
c) Stade de maturation	6
I.3. Le Maïs	7
I.3.1.Origine du maïs	7
I.3.2.Classification	7
I.3.3. Caractéristiques agro-morphologiques	7
I.3.4.Le grain du Maïs	8
I.3.5.Cycle de développement	9
a) La période végétative	9
b) La période reproductrice	9
c) La phase de développement du grain et de maturation	9
II. Mycoflore	11
II.1.Généralité sur les champignons toxinogène portés par les semences	11
II.2.Importance des champignons phytopathogènes transmis par les semences	12
II.3.Contamination des céréales par les champignons pathogènes	13
II.4.Principaux genres fongiques pathogènes	13
II.4.1.Le Genre <i>Aspergillus</i>	13
II.4.2.Le Genre <i>Penicillium</i>	13
II.4.3.Le Genre <i>Fusarium</i>	14
II.4.3.1. Classification classique	15
a). L'anamorphe	15
b) Les téléomorphes	15
II.5.Conditions de développement de la mycoflore portées par la semence	16
a)Les blessures	16
b) Température	16
c) Composition gazeuse	16
d) La lumière	17

e) Le substrat	17
f) Les facteurs biologiques	17
III. Les Mycotoxines	18
III.1. Définition	18
III.2. Les principales mycotoxines des graines des céréales	18
III.3. Biosynthèse des mycotoxines	19
III.4. Les aflatoxines	19
III.4.1. Propriétés physico-chimique	19
III.4.2. Formules chimique du type d'Aflatoxine	20
III.5. Les trichothécènes	20
III.5.1. Propriétés physico-chimique	21
III.6. Les Fuminosines	21
III.6.1. Propriétés physico-chimiques	22
III.7. Les effets toxiques des mycotoxines	22
III.8.1. Chromatographie sur couche mince	23
III.8.2. Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G)	23
III.8.3. Chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C)	24
III.8.4. Méthodes immunochimiques	24
III.9. Méthodes biologiques	24
III.10. Prévention et les procédés de décontamination	24
a) Au champ	24
b) A la récolte	24
c) au stockage	25
III.10. Réglementation	25
Partie II : Matériel et méthodes	
I. Matériel végétale	26
I. Matériel végétale	27
II. Méthode d'isolement	27
II.1. Méthode d'isolement de la mycoflore externe	27
II.2. Méthode d'isolement de la Mycoflore interne : spécialement les <i>Fusarium</i>	27
II.3. Calcul de la fréquence et l'abondance des espèces fongiques	27
II.4. Méthodes de Purification	28
II.4.1. Repiquage successif	28
II.5. Méthode de conservation	28
II.6. Identification et Description des caractères morphologiques et microscopiques	28
II.6.1. Critères d'identification microscopique	28
II.6.2. Critères d'identification macroscopique	28
II.7. Analyses mycotoxicologiques	29
II.7.1. Extraction et purification à partir du milieu de culture liquide (extraction liquide/liquide)	31
II.7.3. Mise en culture des isolats de Fusarium pour la production des spores en milieu liquide CMC	33
II.7.4. Milieu synthétique pour les mycotoxines	33
II.7.5. Extraction et purification des trichothécènes « TCTB » à partir du milieu de culture liquide MS	33

III. Chromatographie sur couches mince monodimensionnelle (CCM)	34
III.1. Principe	34
III.2. Technique pour l'identification potentielle toxino­gènes des isolats d'Aflatoxines et Ochratoxines	34
III.3. Technique pour l'identification potentielle toxino­gènes des isolats des trichothécènes B	35
IV. Révélation des de plaque chromatographique	36
IV.1. Principe	36
IV.2. Technique de révélation	36
Partie III : Résultat et discussion	
I. Isolements et identification de la mycoflore totale associée aux semences	37
I.1. Identification de la mycoflore externe isolée	37
I.2. Identification de la mycoflore interne isolée (<i>Fusarium</i>)	40
I.3. Discussion	43
II. Identification des différents isolats obtenus	44
III. Identification toxino­gènes des espèces d' <i>Aspergillus</i> , <i>Pénicillium</i> et <i>Fusarium</i> par CCM	60
III.1. Discussion	64
Conclusion	65

Résumé

Les céréales occupent une place importante en Algérie de par leur diversité que l'intérêt nutritionnel et agronomique, aussi beaucoup de produits agricoles, il sont le siège d'une mycoflore qui peut développer aussi bien en plein champ qu'au cours du stockage L'incidence population biologique sur la qualité biologique sur la qualité de conservation de ces produits devient une problématique pour leur valeur nutritionnelle. Parmi la flore qui se développe la mycoflore interne et externe tels que l'*Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* c'est deux dernier sont des producteurs potentiel de mycotoxines et dont certaines sont très dangereuse pour la santé humaine et/ou animale (Aflatoxine, Trichotécène, Fumonisine).

L'objectif de ce travail est de L'étude de l'état sanitaire des semences de blé et maïs et de l'identifier les différentes espèces de la mycoflore interne et externe isolées à partir les semences de blé et maïs. Nous avons obtenu une grande diversité avec une dominance d'*Alternaria*, les *Fusarium* (*Fusarium culmorum*, *Microdochium nivale*, *Fusarium tricinctum* et *Fusarium poae*).

Test du pouvoir mycotoxinogène sur milieu (YES) et (MS) révélation et détection de des Aflatoxines, Ochratoxines et trichotécène par la méthode CCM (chromatographie sur couches minces), Révélé que certains isolats comme les *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium culmorum* sont toxique.

Mots Clés : Céréales, semences, identification, potentiel toxinogène, Mycoflore interne et externe. *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, mycotoxines. Trichotécène, Ochratoxines, Aflatoxines.

Abstract

Céréales occupe un important place in Alegria because of their diversity and nutritional and agronomic interest as much of agricultural products, it is the Member of a mycoflora that can develop both in the field and during storage impact biological population on the biological quality on the quality of life of these products becomes a problem for their nutritional value. Among the flora that is developed. The mycoflora internal and external such as *Alternaria*.

Penicillium.*Aspergillus*, *Fusarium* is two last are potential producers of mycotoxins and some of which are very dangerous to human or animal health (Aflatoxin, Trichotécène, Fuminosine).

The objective of this work is the study of the health status of seed of wheat and corn and to identify the different species of the internal and external mycoflora isolated from seeds of wheat and corn.

We got à great diversity with a dominance of *Alternaria*, *Fusarium* (*Fusarium culmorum*.

Microdochium nivale. *Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae*.

Test of power mycotoxinogene on environment (YES) and (MS) revelation and detection of Aflatoxin, Ochratoxines and Trichotécènes by the CCM method, revealed that some isolates as *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp and. *Fusarium* sp are toxic.

Key words : Cereals, seeds, identification, potential toxigenic Mycoflora internal and external. *Fusarium*, *Penicillium Aspergillus*, mycotoxines.trichotecenes, Aflatoxins.

تلخيص

الحبوب تحتل مكانة هامة في الجزائر بسبب تنوعها وفائدتها الغذائية والزراعية كجزء كبير من المنتجات الزراعية، الحبوب من مقدرات نمو الفطريات التي يمكن أن تتطور في الحقل وأثناء التخزين. تأثير مثل هذه المجمعات البيولوجية يؤثر على نوعية هذه المنتجات البيولوجية في نوعية الحياة يصبح مشكلة بالنسبة لقيمتها الغذائية. ومن هذه الفطريات *Fusarium* هو من المنتجين للسموم الفطرية وبعضها خطير على صحة الانسان او الحيوان (زيرالينون.تركوتسين الخ) والهدف من هذه الاطروحة هو دراسة الحالة الصحية لبذور القمح والذرة وتحديد الأنواع المختلفة من نمو الفطريات *Fusarium* الداخلية والخارجية المعزولة من بذور القمح والذرة. حصلنا على تنوع كبير من الاصناف مع هيمنة *Alternaria culmorum*, *Microdochium nivale*, *Fusarium tricinctum* et *Fusarium poae*. دراسة القدرة الممرضة الناتجة عن طريق الوسطين الحيويين (YES) و (MS) اكتشاف الأفلاتوكسين، أوتشتراتوكسينس والتريكوثيين بواسطة تقنية الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة ان بعض عزلات الفطر *Fusarium sp* و *Penicillium sp* و *Aspergillus* سامة الكلمات الرئيسية: الحبوب، والبذور، الفطريات الداخلية والخارجية، القدرة. *Fusarium*, *Penicillium* *Aspergillus*. الممرضة، سموم الفطرية، الأفلاتوكسين، أوتشتراتوكسينس والتريكوثيين

Figure 1 : Schéma d'un grain de blé	5
Figure 02 : Cycle de développement du blé	6
Figure 3 : Les différents constituants de la graine du maïs	8
Figure 4 : Cycle du développement de la variété tardive du maïs	10
Figure 5 : Structure moléculaire des aflatoxines AFB1 et AFM1	20
Figure 6 : Structure générale des trichothécènes (a) et (b).	21
Figure 7 : Structures chimiques des Fumonisines	22
Figure8 : Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines	30
Figure 9 : Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide	32
Figure 10 : Séparation les deux phases	33
Figure 11 : CCM monodimensionnelle	35
Figure 12 : Cuve de développement	36
Figure 13 : Présentation des % d'infestations de la mycoflore externe chez le blé et Maïs par région et par variétés	39
Figure 14 : Caractérisation macroscopique et microscopique de l'espèce de <i>Fusarium</i> obtenue.	46
Figure 15 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de <i>Fusarium</i> obtenue.	49
Figure16 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de <i>Fusarium</i> obtenue.	52
Figure 17 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces d' <i>Alternaria</i> obtenue.54	54
Figure 18 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de <i>Penicillium</i> et <i>Aspergillus</i> obtenue	56
Figure 19 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces <i>colletotrichum</i> et <i>Rhizopus</i> obtenue	59
Figure 20 : les souches utilisant l'extraction liquide/liquide	60
Figure 21 : plaque CCM sous les rayons UV de 360nm.	61
Figure 22 : plaque CCM sous les rayons UV de 360nm	62

Tableau 01 : Composition des différentes parties du grain	5
Tableau 2 : composition chimique du grain de maïs	8
Tableau 03 : Les principales moisissures contaminant les céréales	18
Tableau 04 : liste des lots des variétés de blé analysés	26
Tableau 05 : Evaluation du taux de contamination des semences par la mycoflore externe	38
Tableau 06 : L'abondance et les fréquences relatives des espèces isolées (mycoflore interne	40
Tableau 07 : Evaluation du taux de contamination des semences par la mycoflore interne	41
Tableau 08 : abondance et niveau d'infestation des espèces <i>Fusarium</i> isolés partir des échantillons de blé et maïs selon la région de récolte	42
Tableau 09 : Fréquence d'isolement des espèces de <i>Fusarium</i> à partir des grains infestés	43
Tableau 10 : Liste des espèces obtenues de mycoflore interne et externe	45
Tableau 11 : Liste des Isolats utilisés pour le CCM	61
Tableau 12 : Liste des Isolats utilisés pour le CCM	62

µg : microgramme

15-DON : 15- acétyl-déoxynivalénol

3-ADON : 3-acétyl-déoxynivalénol

A : *Aspergillus*

AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

a_w : activité de l'eau (Activity of water)

CMC : Carboxyle méthyl cellulase

DCPA : Dichloranchlormphenicol Peptone Agar

DON : le déoxynivalénol

F : *Fusarium*

FAO : Food Agriculture Organization

H : Hauteur

mg : milligramme

ml : millilitre

MS : Mycotoxine Synthetic medium

NIV : Nivalénol

Nm : Nano gramme

PDA : Potato Dextrose Agar

q : quintal

RF : rapports frontaux

TCTB : Trichotécène B

U.V : Ultrat Violet

YES : Yeast Extract Sucrose

Les graines de céréales constituent, depuis toujours, la principale ressource alimentaire de l'homme et de l'animal et possèdent un pouvoir nutritionnel important. Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage. Malheureusement, de nombreux agents de détériorations (vertébrés, insectes, moisissures, acariens,...) peuvent altérer les graines stockées (Pfohl-Leszkowicz.1999).

Les champignons transmis par les semences représente mondialement les agents pathogènes les plus dangereux pour les céréales, la présence des diverses espèces de champignon sur les grains peut réduire leur qualité boulangère et de brasserie et les infecter en plus de toxines dangereuses (mycotoxines) (champion, 1997).

Quel que soit son origine, la semence est extrêmement vulnérable aux microorganismes et constitue un réservoir de leurs métabolites. L'association étroite entre le pathogène et la semence, le transport des microorganismes pathogènes par les semences infectées, l'accroissement considérable du volume des échanges commerciaux nationaux et internationaux constituent un moyen particulièrement efficace de transmission de nombreuses maladies (Cappelli, 1997) et favorisent la diffusion des organismes pathogènes d'un pays, voire d'un continent à l'autre (Neergaard, 1981). Ce qui contribue à l'aggravation des risques de propagation de ces contaminations.

Les champignons constituent la cause principale d'altération diverse, c'est la conséquence de leur grande diversité et de leur remarquable facilité d'adaptation et d'évolution sur 11000 espèces fongique, environ une centaine est potentiellement toxigènes et une cinquantaine peuvent se rencontrer sur les aliments peu hydratés (cahagnier, 1998). Du champ au silo les espèces dans les grains évoluent et l'on distingue une flore du champ, puis flore intermédiaire à la quelle se substitue une de stockage. Certains ne présentent pas des risques sanitaires, les espèces à risque mucotoxinogènes sont principalement les *Fusarium* au champ ainsi que les *Aspergillus* et les *Penicillium* au cours du stockage (AFFSA, 2006).

Vu les problèmes sanitaires et les pertes économiques causés par la contamination des cultures par les mycotoxines, un grand intérêt est actuellement attribué à travers le monde à ces substances pour que chaque pays ou chaque région se doive adopter une législation spécifique pour chaque mycotoxine et chaque aliment susceptible d'héberger des moisissures toxigènes dans le but de cerner les problèmes engendrés à long terme par ces substances.

C'est dans ce contexte s'inscrit notre travail :

- ✓ Evaluer le taux de contamination des graines et d'isoler la mycoflore totale (mycoflore interne et externe).
- ✓ Identifier les isolats de la mycoflore totale présente dans les différents lots collectés.
- ✓ Dans un deuxième temps, une analyse du potentiel toxigène particulièrement les aflatoxines et les trichotécène B qui sont réalisées dans le but d'identifier les isolats d'*Aspergillus*, *penicillium* et *Fusarium* toxigènes et les types des toxines qu'ils produisent en se basant sur les tests physico-chimiques, la chromatographie sur couche mince (CCM).

CHAPITRE I : DONNEES SUR LES CEREALES :

Les céréales occupent environ 2,9 millions d'ha (moyenne 2000-2012), soit près de 35% des terres arables. Durant les cinq 05 dernières années de (2008-2012) la production moyenne des céréales a légèrement dépassé 32 millions de quintaux avec un rendement aux alentours de 11q/ha selon la F.A.O 2012, cette production est basée sur le, Blé avec 19 millions de q soit (60%) dont (70% blé dur et 30% de blé tendre) 13 millions de q d'orge soit (40%) généralement destiné à l'alimentation des bétails.

Le maïs, le blé et le riz sont les trois principales céréales cultivées dans le monde. En 2013, la Chine confirme son rang de premier producteur mondial de céréales (18% du total), devant les États-Unis (16%), l'Union européenne (11 %) et l'Inde (9%). La Chine et l'Inde concentrent à elles seules la moitié de la production mondiale de riz. Les autres principaux pays producteurs de céréales sont les pays de la mer Noire (Russie, Ukraine), le Canada et certains pays d'Amérique du Sud (Brésil, Argentine). La production de céréales s'est nettement accrue en Chine et aux États-Unis depuis le début des années 2000 (F.A.O, Eurostat, agreste.2013)

A l'échelle mondiale, les céréales occupent une vaste superficie, 666.50 millions s'hectares dont la production 2 526 millions de tonnes (FAO, 2015).

I.1.Importance de la céréaliculture :

En Algérie, la céréaliculture à une importance stratégique puisqu'elle est à la base de la sécurité alimentaire du pays, le blé dur et le blé tendre sont les céréales les plus cultivées pour l'alimentation humaine. (Fourar, 2015).

La production de céréales en Algérie est marquée par une forte irrégularité, elle-même conditionnée par les aléas climatiques .Ainsi, sur les 40 dernières années, on enregistre un écart de 1 à 5 entre une année calamiteuse (9,7 millions de q en 1994) et une année d'abondance (52,5 millions de q en 2009). Cependant, les progrès technico-économiques, s'ils ne parviennent pas à stabiliser la production du secteur, ont permis de l'augmenter signifie activement : la moyenne décennale a ainsi presque doublé entre 1981-90 (18,2 millions de q) et 2001-2010 (34,9 millions de q), avec une progression régulière qui a permis d'accompagner la progression démographique (de 19 à 38 millions d'habitants entre 1980 et 2012) (Rastoin et al, 2014).

I.2.Le Blé

I.2.1.Origine du blé :

Depuis la naissance de l'agriculture, Le blé est porte une valeur nutritionnelle extrêmement importante car il prend une place importante parmi les quelques espèces de cultures étant largement cultivée comme sources de nourriture de base (Šramková et al, 2009).

Le blé occupe la première place pour la production mondiale et la deuxième après le riz, il assure 15% de ses besoins énergétiques (Bajji, 1999). Le blé est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climat arides et semi-arides là où l'agriculture est dans la plus mauvaise passe. Ces régions se caractérisent par l'augmentation de la température couplée à la baisse des précipitations, en plus la désertification et la sécheresse (Abeledo et al, 2008).

I.2.2. Historique :

Le blé est l'une des principales ressources alimentaires de l'humanité. La saga du blé accompagne celle de l'homme et de l'agriculture ; sa culture précède l'histoire et caractérise l'agriculture néolithique, née en Europe il y a 8000 ans. La plus ancienne culture semble être le blé dur dans le croissant fertile de la Mésopotamie (Feillet, 2000).

I.2.3.Biologie de la plante :

Le blé est une monocotylédone qui appartient au genre *triticum* de la famille des *gramineae*. c'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscant, appelé caryopse, constitué d'une graine et de téguments. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*triticum aestivum*) et le blé dur (*triticum durum*) (Martinet et al, 1999)

I.2.4.Physiologie :

Le blé correspond à la sous espèce *Triticum aestivum vulgare*, et se présente sous diverses formes et variétés. La plante adulte possède un brin maître et une ou deux talles. Chaque tige se termine par des épis blancs, parfois roux, portant 12 à 15 épillets chacun. Chaque épillet contient 2 ou 3 fleurs fertiles capables de s'autoféconder, entraînant ainsi la formation d'un grain (Monsiniak, 2006).

I.2.5.Le grain de blé :

Le grain de blé est un caryopse nu, blanc ou roux, ovoïde et pesant 35 à 45 mg. Il est composé d'un embryon correspondant à un nouvel individu et d'un albumen dont la fonction est d'être un tissu de réserve. La graine est entourée de tissus protecteurs permettant de conserver l'embryon et l'albumen, jusqu'à ce que les conditions environnementales permettent la germination (Monsiniak, 2006).

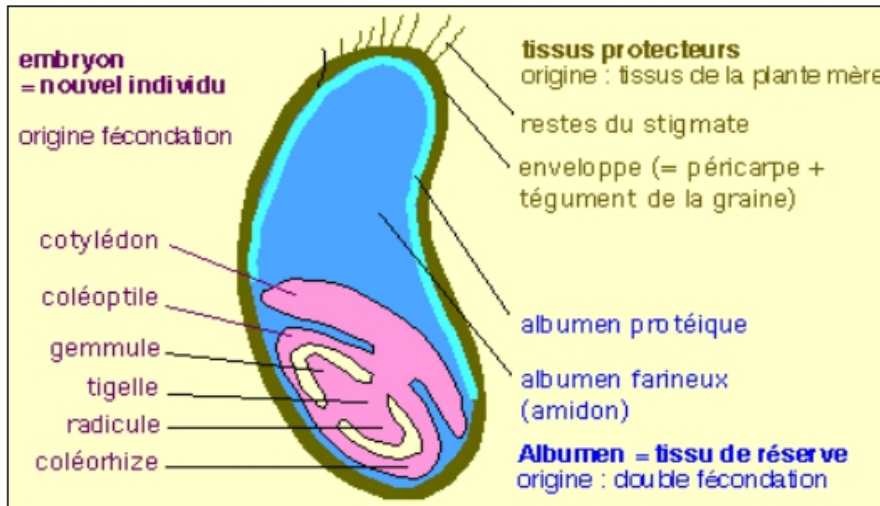


Figure 1 : Schéma d'un grain de blé (Mossiniak, 2006).

I.2.5.1 Composition du grain :

Toutes les céréales présentent les mêmes constitutions à savoir : enveloppe, amande farineux et germe de la future plantes dont le blé. Ce qui diffère est le pourcentage de la répartition des différents constituants chimiques, que ce soit à l'intérieur des différentes parties de la graine (tableau01).

Tableau 01 : Composition des différentes parties du grain de blé

Partie du grain	% du grain	Composition en pourcentage
enveloppes	9%	Cellulose : ≥ 20
Assisse protéique	8%	Protide : 20, lipides : 9, minéraux : 16 vitamines
albumen	80%	Amidon : 72, protides : ≥ 10 , gluten
Embryon	3%	Protide : 26, lipides : ≥ 10 , glucide : 10, minéraux : 4.5, vitamines

Source : (Roudant et al, 2005).

I.2.6.Cycle de développement du blé :

En général, toutes les céréales ont le même cycle de développement selon (Bouffenaar et *al*, 2006) le développement représente l'ensemble des modifications phénologiques qui apparaissent au cours du cycle de la culture. Les dates de déclenchement des stades de développement dépendent essentiellement des températures et des photopériodes accumulées par la culture depuis sa germination. Trois périodes repères caractérisent le développement du blé à savoir : la période végétative, reproductrice et période de formation du grain et maturation.

- a) **Stade végétatif** : où se fait la différenciation des racines et des feuilles.
- b) **Stade reproducteur** : caractérisé par l'apparition de l'épi et la formation des graines.
- c) **Stade de maturation** : qui s'étend entre la fécondation et la maturation du grain.

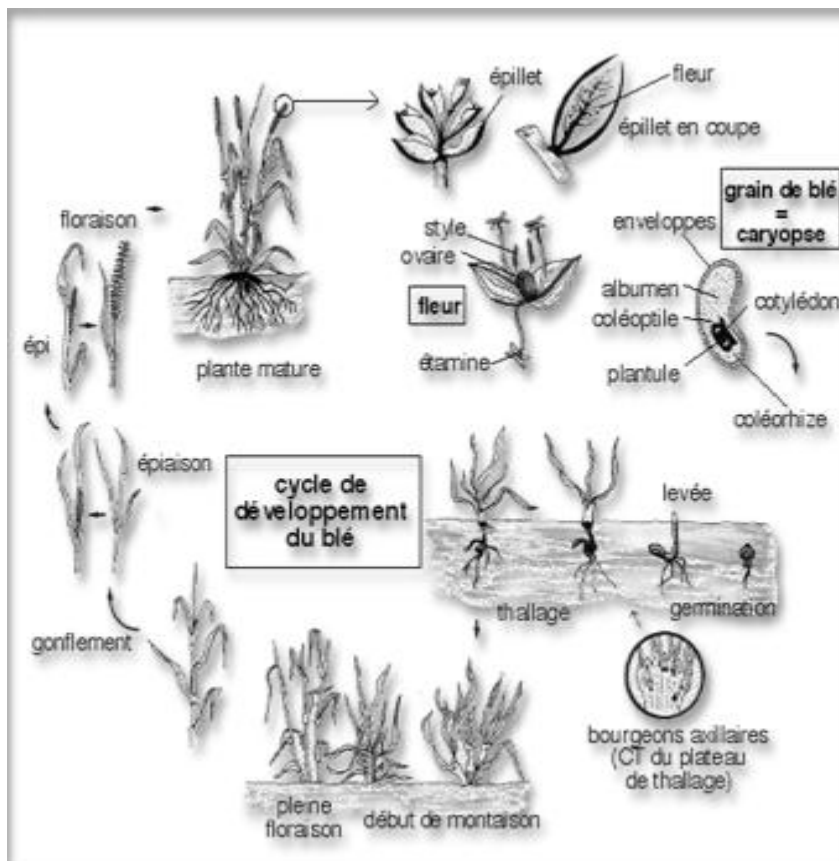


Figure 02 : Cycle de développement du blé (henry et DE buyser, 2000).

I.3.Le Maïs :

I.3.1.Origine du maïs :

L'origine du maïs a suscité de nombreuses polémiques. Les uns soutiennent qu'il serait originaire du vieux monde correspondant actuellement à l'Europe, l'Asie et l'Afrique ; cela parce qu'il était déjà cultivé dans le bassin méditerranéen bien avant la découverte du continent américain en 1492. D'autres, sans doute les plus nombreux, pensent qu'il serait originaire de l'Amérique centrale, plus précisément des hauts plateaux mexicains où de nombreux échantillons témoigneraient de sa présence il y a plus de 5000 ans avant Jésus-Christ (Gay, 1984).

I.3.2.Classification :

Le maïs est une plante herbacée annuelle, monocotylédone de la grande famille des graminées. Il est par ailleurs organisé dans le genre *Zea*. Le genre *Zea* comprend les taxons sauvages, connus collectivement comme le téosinte (*Zea mays ssp. tectorum*) et maïs domestiqués ou du maïs (*Zea mays L. ssp. mays*) (Buckler, 2005).

I.3.3. Caractéristiques agro-morphologiques :

Le maïs, *Zea mays*, est une céréale herbacée annuelle (Jaritz et Bonnefante, 1997). C'est une plante monoïque. Il porte deux types d'inflorescence : les fleurs mâles, groupées sur la panicule terminale ramifiée, et les fleurs femelles associées sur un ou quelques épis insérés à l'aisselle des feuilles. Bien que le maïs soit auto-fertile, l'allogamie est prépondérante, et atteint 95 %. Elle résulte de la monoécie et de la protandrie de la plante (Marchand et al. 2003).

Le maïs présente une large diversité agro morphologique. Son cycle du semis à la maturité varie de deux à onze mois, le nombre de ses feuilles est de 8 à 48, la hauteur de sa tige est de 0,6 à 3 mètres. Contrairement aux autres *Poaceae*, le maïs ne talle pas en général (Pommela et al, 2006). L'épi, long de 2,5 à 30 centimètres, peut comporter huit à plus de vingt rangées de grains. Le système racinaire est de type fasciculé et adventif. En outre, les racines sont de deux types : séminales et adventives ; les séminales sont les premières à se former suivies des adventives, qui prennent la forme de couronnes à partir des entre-nœuds les plus bas de la tige (Soltner, 2005)

I.3.4. Le grain du Maïs :

La composition du grain de maïs, à l'instar de celle des autres graines céréalières, varie selon les pratiques culturales, les types de semences et de sols, les conditions climatiques et d'autres facteurs. Le tableau 2 énumère les principaux constituants de la graine de maïs.

Tableau 2 : composition chimique du grain de maïs

Constituants	Composition %
Hydrates de carbone	80.0
Protéines	10.0
Lipides	4.5
Fibre	3.5
Minéraux	2.0

Se composent d'albumine (7%),de globuline (10%),de prolamine ou zéine (39%) et de glutamine (35%).l'albumine, la globuline et la gluteline sont les principales protéines du germe, tandis que la zéine et la gluteline sont concentrées dans l'endosperme. Les protéines de maïs sont déficitaires en lysine et en tryptophane. L'amidon est le composant d'hydrates de carbone prédominant. Le rapport amylose/amylopectine est généralement de 27,73.La graine du maïs se compose principalement de l'enveloppe,du germe et de l'endosperme.l'enveloppe ou son. Soit environ 5% de la graine. Est généralement réservée aux animaux. Le germe ou embryon environ 12% de la graine. Renferme la plus grande partie de l'huile contenue dans le maïs et possède une haute valeur nutritive puisqu'il est riche en protéines. En sels minéraux et en substances solubles, la partie principale est l'endosperme qui représente 82% de l'ensemble de la graine. A l'extrémité la coiffe constitue la plus petite portion de la graine : 1%.(Asiedu, 1999).

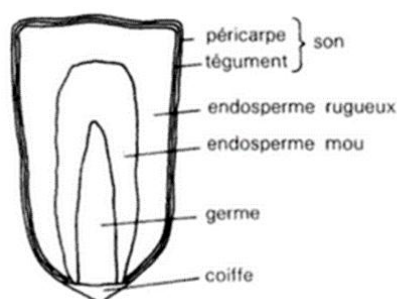


Figure 3 : Les différents constituants de la graine du maïs (Asiedu, 1999).

I.3.5.Cycle de développement :

Le cycle du maïs s'effectue durant une période allant de 100 à 130 jours suivant la variété et les lieux de la culture, il se divise en trois grandes phases : végétative, reproductrice et maturation du grain.

a) La période végétative :

La croissance et le développement commence par la germination de la graine. La germination exige une température minimale de 5°C, mais n'est active qu'à partir de 10°C et demande alors une dizaine de jours. La coléoptile conduit la première feuille jusqu'à la surface, et des racines primaires sont émises de la coléorhize. De la levée au stade 6-8 feuilles, le maïs s'installe. Sa croissance est faible et dépend surtout de la température et de la facilité de réchauffement du sol (Hallauer et Miranda, 1981).

b) La période reproductrice :

Du stade 6-8 feuilles à la floraison : Au stade 6-8 feuilles, selon les variétés, l'apex développe en quelques jours la panicule mâle. Huit à dix jours plus tard, un ou deux bourgeons axillaires évoluent en épis femelle, sur lequel (ou lesquels) apparaissent des fleurs femelles et des soies. De la floraison mâle à la fécondation : l'émission du pollen commence quelques jours après l'apparition de la panicule mâle, et dure environ une semaine. Le pollen tombe sur les soies, y germe et va jusqu'à l'ovule pour le féconder (Pommela et al, 2006).

La fécondation est nécessairement croisée : le pollen d'un pied est émis par la panicule avant que les soies n'apparaissent complètement. La fécondation intervient 48 à 72 heures après la pollinisation. La germination des grains de pollen demande des soies suffisamment gorgées d'eau particulièrement dans le cas de manque d'eau (Hallauer et Miranda, 1981).

c) La phase de développement du grain et de maturation :

Le grain se gonfle d'abord d'eau puis de réserves au dépend des tiges et des feuilles. Il passe alors par trois stades : Le stade laiteux (80% d'eau), puis le stade pâteux (50% d'eau). Le grain est nettement denté et les spathes commencent à jaunir et enfin le stade rayable à l'ongle dont le grain ne contient plus que 35% à 38% d'eau (Hallauer et Miranda, 1981). Toute pénurie d'eau, d'éléments nutritifs ou de rayonnement solaire excessif au cours des premières semaines du développement des grains affectera ceux situés à l'extrémité de l'épi, en les recroquevillant ou les avortant (Soltner,

2005). Le maïs est très sensible au stress (contrainte) hydrique à ce stade, étant donné ses besoins plus importants en eau (jusqu'à 10 mm par jour dans des conditions très chaudes et sèches).

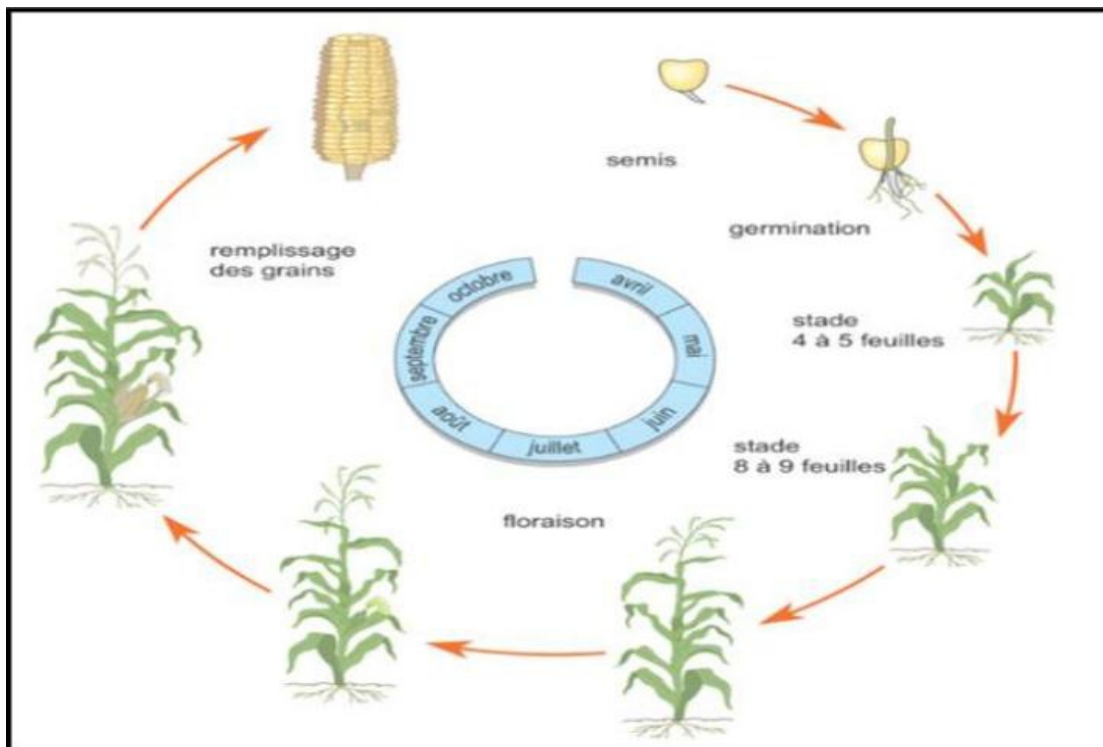


Figure 4 : Cycle du développement de la variété tardive du maïs (Soltner, 2005)

II. Mycoflore

Les graines sont considérées comme un moyen très efficace pour le transport des agents pathogènes des plantes sur de longues distances. (Agarwal et al, 1996).

Les maladies transmises par les semences ont été trouvées à influencer sur la croissance et la productivité des plantes cultivées (Kubiak and Korbas, 1999 ; Weber et al, 2001 ; Dawson and Bateman, 2001). Un pathogène de semences présente en interne ou en externe ou associé à la postérité comme contaminant, peut provoquer l'avortement des semences, pourriture des semences, nécrose de la graine, réduction ou l'élimination de la faculté germinative ainsi que des semis dommages résultant dans le développement de la maladie à un stade de développement. (Khanzada et al, 2002 ; Bateman and Kwasna, 1999).

Plus de 150 espèces des moisissures et des levures filamenteuses ont été rendues compte dans les grains de céréale. La plupart des moisissures sont trouvées probablement sur les grains de céréales comme contaminants extérieurs (Christensen, 1982).

Les fourrages et les céréales sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre (a_w), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany et Yiairnikouris, 2002).

Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité (20 à 25%) pour leur croissance (Hesseltine, 1976), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (Molinié et Pfohl-Leszkowicz, 2003).

II.1. Généralité sur les champignons toxigènes portés par les semences :

Les champignons toxigènes des semences sont caractérisés par des hyphes qui croissent et constituent le mycélium ou thalles, responsables de la production des enzymes et des mycotoxines (Iarpent et Iarpent-gourgaud 1997).

En effet un stock de semence entreposé dans un silo est un système écologique constitué d'organismes vivants. Placé dans un environnement caractérisé par son microclimat.

C'est un biotope artificiellement créé par l'homme dont l'équilibre instable peut être détruit par des agressions d'ordre abiotique (facteurs du milieu) abiotique (facteurs biologiques).

Les champignons toxinogènes sont classés en 4 groupes suivant le moment auquel ils se développent :

- Pathogène pour la plante (*F. graminearum* élaborant la zéaralénone).
- Champignons poussant et produisant la mycotoxines sur plantes sénescences ou stressées (*A. flavus* produisant les aflatoxines).
- Champignons colonisant à l'origine la plante et prédisposant celle-ci à la contamination par la mycotoxine lors de la récolte (*F. roseum* produisant des trichothécènes).
- champignons existant dans le sol et dans le matériel de putréfaction et qui proliféreront lors du stockage (*A. ochraceus* et *P. viridicatum* élaborant tous deux l'ochratoxine A) (Pfohl leszkowicz et Categnaro, 2002).

Mais la présence de moisissures sur les graines ne signifie pas nécessairement formation de mycotoxines. La synthèse de ces métabolites secondaires et leur quantité n'est pas seulement influencée par des paramètres environnementaux et nutritionnels au moment de la production, mais elle est conditionnée au préalable par la croissance et le développement d'un champignon bien particulier.

II.2.Importance des champignons phytopathogènes transmis par les semences :

Selon Cappeli (1997), l'importance économique des pathogènes transmis par les semences peut être rapportées à différents cause :

- Les semences permettent la conservation des pathogènes à travers le temps et l'espace
- Les pathogènes vivent plus longtemps que la semence qui les porte et il y a une transmission prolongée
- Les champignons pathogènes ressentent une action directe sur la germination (formation des semences mortes, réduction de la vigueur, attaque en pré émergence et fontes de semis)
- La transmission des champignons par la semence peut entraîner la sélection préférentielle des souches pathogène comme par exemple, il y a distribution uniforme dans le champ des foyers d'inoculum primaire qui permettent sa large dissémination dans la culture et/ou l'infection permanente d'un sol
- Introduction du pathogène dans les régions encore indemnes.
- Après l'implantation d'un pathogène est possible outre, la contamination d'un sol, l'infection des nouveaux hôtes, des mauvaises herbes et conservation dans les repousses des hôtes infectés.
- Les plantes issues des semences infectées normalement sont colonisées par le pathogène plus uniformément par apport à celles infectées durant les stades successifs de développement

- Parfois dans un nouveau milieu, se réalisent des conditions plus favorables à la croissance

II.3. Contamination des céréales par les champignons pathogènes :

Les céréales sont sans doute les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les moisissures et leur mycotoxines, car ils offrent aux champignons de très bonnes conditions de développement vu leur richesse en glucides reconnus comme principales sources d'énergie. Cette croissance des micromycètes pourra altérer les propriétés technologiques des matières premières et favoriser la production et l'accumulation de mycotoxines (Bennett et al, 2003). La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, du stockage et après transformation des graines. En général ce sont les insectes qui sont les vecteurs (Dunkel, 1988)

Si de très nombreuses études sont disponibles concernant la contamination mycotoxique des céréales, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. De manière schématique, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et les conditions climatiques pendant le développement et/ou le stockage des grains.

II.4. Principaux genres fongiques pathogènes :

II.4.1. Le Genre *Aspergillus* :

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Roquebert, 1998, Botton et al, 1990, Rapere et Fennell, 1965). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

II.4.2. Le Genre *Penicillium* :

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des Ascomycètes. Il comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicilliums* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost et les céréales.

II.4.3. Le Genre *Fusarium* :

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes. Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (Nelson et al, 1983).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes (Duran et al, 1989). De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine) (Trenholm et al, 1988).

La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* et une espèce du genre *Microdochium*. Parmi ces espèces, cinq sont principalement responsables de la fusariose, il s'agit de *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* et *Microdochium nivale* (Parry et al, 1995). La distribution et la prédominance de ces espèces pathogènes sont, pour une grande part, déterminées par l'espèce céréalière.

La contribution de chaque souche à la lésion de l'épi et l'interaction entre les souches sont encore mal connues (Parry et al, 1995). La fusariose de l'épi est soit accompagnée ou précédée par des attaques sur le collet et les racines. La pourriture racinaire, la pourriture du pied et la pourriture commune, sont des noms qui se rapportent à une même maladie d'origine fongique et qui peut affecter le blé.

Aux Etats-Unis d'Amérique, *F. graminearum* est l'espèce prédominante responsable de l'épidémie, de même qu'en Chine et en Nouvelle Zélande. L'analyse de la bibliographie de ces dernières années permet la représentation schématique de la flore fusarienne sur blé en Europe. Les espèces *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* sont prédominantes. Puis, les espèces *F. culmorum*, *F. tricinctum* et *F. sambucinum* sont également importantes.

II.4.3.1. Classification classique

a. L'anamorphe :

C'est la forme imparfaite des champignons dont la reproduction asexuée est connue. La multiplication asexuée fait intervenir des conidies de formes et d'organisations très variées. Dans la classification conservant la division des Deuteromycota, le genre *Fusarium* doit être placé dans:

Classe: Hyphomycètes, thalle filamenteux septé

Ordre: Tuberculariales, présence de sporodochies

Famille: Tuberculariaceae : seule famille de l'ordre (Botton et *al.*, 1985).

b. Les téléomorphes :

C'est la forme parfaite des champignons dont la reproduction sexuée est connue. Les téléomorphes de *Fusarium* sont des Hypocréales appartenant à la sous-division des Ascomycotina.

Classe: Hymenoascomycètes, présence d'un ascocarpe avec couche fertile.

Ordre: Hypocréales

Sous-classe : Pyrenomycetidae, l' ascocarpe est un périthèce

Famille: Hypocreaceae, ascospores non filiformes multiseptées (Botton et *al.*, 1985).

Les formes parfaites de *Fusarium* sont: *Gibberella* Sacco *Nectria* (Fr.) Ains, un champignon dont les formes parfaites et imparfaites sont connues sera nommé de la manière suivante: *Gibberella zeae* f.c. *Fusarium graminearum* (fc. = forme conidienne) La double nomenclature enlève toute ambiguïté. Le genre *Nectria* a plusieurs anamorphes et le genre *Fusarium* a plusieurs téléomorphes. Il existe également *Michrodochium nivale* autrefois appelé *Fusarium nivale*. Il a été exclu genre *Fusarium* dans les années 80. Cette espèce est responsable de fusarioses importantes et provoque les mêmes symptômes sur céréales que les autres *Fusarium*, c'est pourquoi les *Michrodochium nivale* sont communément cités dans les publications avec les *Fusarium*. Les *M. nivale* sont classés en deux sous-variétés: *M nivale* var. *nivale* et *M nivale* var. *majus*. Les différents *Fusarium* s'attaquent préférentiellement à une culture céréalière. Ainsi *Fusarium moniliforme* se développera principalement sur des cultures de maïs, alors que *Fusarium graminearum* se développera sur orge, blé ou maïs, (Jeunot, 2005). Le nom de *Fusarium graminearum* était utilisé pour décrire ce que nous savons maintenant être un groupement polyphylétique d'espèces fongiques très distincts. Avant 1999, les champignons homothalliques

provoquant les brûlures fusariennes de l'épi de blé et d'orge étaient connus sous le nom de *F. graminearum* «groupe 2» pour les distinguer du «groupe 1» qui regroupe des *F. graminearum* hétérothalliques qui causent la fonte de semis et la fusariose du collet. On a su plus tard que ces champignons étaient séparés par la biologie phylogénétique des espèces, chacune produisant leurs propres caractéristiques d'état sexuel. L'ancien «groupe 1» est maintenant connu comme *Fusarium pseudograminearum* et a un stade sexuel appelé *Gibberella coronicola*, (Aoki et al, 1999).

II.5. Conditions de développement de la mycoflore portées par la semence :

Les céréales sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre (*aw*), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany et Yiainikouris, 2002).

a. Les blessures :

Les blessures des parois ou des enveloppes externes des aliments, et les dommages mécanique et ceux infligés aux fruits par les intempéries favorisant le développement d'*Alternaria*. Et les insectes propageront le *Fusarium* dans les maïs. Aussi les dommages liés aux conditions de stockage peuvent accroître ou sélectionner certaines populations fongiques (G.Reboux, 2006).

b. Température :

Les moisissures peuvent se développer entre 0°C et 35°C. Certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *A. fumigatus* jusqu'à 60°C. En général, la température optimale de toxinogénèse est voisine de la température optimale de croissance. Pour d'autres toxines, élaborées par *F. roseum*, la température optimale de toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance, respectivement 15 et 25°C. Parfois, l'apparition de mycotoxine dans les conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1°C à 4°C pour les mycotoxines produites par *F. tricinctum* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

c. Composition gazeuse :

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ a un effet inhibiteur important sur la toxinogénèse (Le Bars et al, 1987).

d. La lumière :

Les rayons lumineux n'ont en général pas d'action sur la croissance des champignons, mais peuvent agir sur la sporulation (Iarpent et Iarpent-gourgaud, 1997).

e. Substrat :

Un champignon n'est pas forcément capable de se développer sur n'importe quel substrat. La composition qualitative et quantitative en certains nutriments et la composition chimique du substrat joue un rôle sélectif d'où il y a une spécificité d'hôte pour les champignons (La Bar, 1988).

f. Facteurs biologique :

Les insectes et acariens sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Dans le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines. la présence simultanée d'autres microorganismes provoque une concurrence entre eux d'une part pour l'espace envahi (Lutz et al, 2003).

III. Les Mycotoxines

III.1. Définition :

Le terme mycotoxine vient du grec «mycos» qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison. Il désigne des métabolites secondaires élaborés par des champignons filamenteux microscopiques ou moisissures vers la fin de la phase exponentielle de leur croissance et n'ont aucune signification biochimique ni pour la croissance et le développement fongique ni pour la compétition (D'Mello et Macdonald, 1997 ; Hussein et Brasel, 2001), parmi les espèces qui produisent les mycotoxines sont les espèces des genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils causent des pertes nutritionnelles et représentent un risque majeur pour la nourriture et chaîne alimentaire. Les humains ont depuis longtemps été exposés aux mycotoxines par plusieurs voies différentes : directement, par l'intermédiaire de denrées alimentaires d'origine végétale, ou indirectement, par des aliments d'origine animale. (Bartkiene et al, 2012).

III.2. Les principales mycotoxines des graines des céréales :

Les grains des céréales sont des vecteurs de mycotoxines très important car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Ce sont des contaminants naturels des céréales ; il est donc normal d'en trouver en faible quantité dans les récoltes. Elles peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Tableau 3 suivant signifie Les principales moisissures contaminant les céréales

Champignons	Toxines	Denrées
<i>claviceps</i>	Alcaloides de l'ergot	Blé et dérivés, seigle
<i>Fusarium</i>	Trichotécène (DON, NIV, Zéaralénone, fumonisine, fusariene, Moniliforme	Blé, orge, riz, seigle, maïs, avoine
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines, stérigmatocystine, ochratoxine A	Maïs, blé
<i>penicillium</i>	Patuline, citrinine, pénitrem A, Ochratoxine A	Blé, riz, orge

Source : (Pfohl-Leszkowicz, A. 1999 in Molinié et Pfohl-Leszkowicz, 2003).

III.3. Biosynthèse des mycotoxines :

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires, qui ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du microorganisme. Le métabolisme secondaire, très important chez les moisissures, aboutit à une grande diversité de molécules, dont les mycotoxines.

Les métabolites secondaires sont très souvent élaborés par familles de produits chimiquement voisins (les aflatoxines, les trichothécènes, etc.). La nature de ces produits, très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales. Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendu possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (Luchese & Harrigan, 1993 ; Steyn, 1980).

Les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques principales : les polyacétates, les terpènes et les acides aminés. Selon la voie de leur biosynthèse, les mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses. (AFSSA, 2006).

III.4. Les aflatoxines :

Les aflatoxines sont un groupe de composés structurellement reliés produits par quelques souches d'*Aspergillus flavus*, d'*A. Parasiticus* et d'*A. Nomius*. Ces champignons peuvent être isolés du sol, la poussière atmosphérique, plantes et insectes. Maïs, arachides, noix et graines de coton sont souvent contaminés par les aflatoxines, ce qui les rend impropres à la consommation humaine et animale. Les aflatoxines sont des agents cancérigènes qui causent la maladie chez le bétail et éventuellement les humains. (Hamed, 2004). Les aflatoxines d'origine naturelle sont les aflatoxines B1, B2, G1 et G2. Normalement, l'aflatoxine B1 prédomine dans les produits contaminés ; les aflatoxines B2, G1, et G2 ne sont généralement pas présentes si AFB1 est absente (Fao, 2003).

III.4.1. Propriétés physico-chimique :

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique), elles sont assez facilement extraites. Sous lumière ultra-violette (U.V. longs), elles sont fluorescentes (bleue pour les AFB "Blue" et verte pour les AFG "green", l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve) (AFSSA, 2006)

III.4.2. Formules chimique du type d'Aflatoxine :

- ✓ AFB1 : formule brute : C₁₇H₁₂O₆
Masse molaire : 312,3 g/mol (voir figure 1)
- ✓ AFB2 : formule brute : C₁₇H₁₄O₆
Masse molaire : 314,3 g/mol
- ✓ AFG1 : formule brute : C₁₇H₁₂O₇
Masse molaire : 328,3 g/mol
- ✓ AFG2 : formule brute : C₁₇H₁₄O₇
Masse molaire : 330,3 g/mol
- ✓ AFM1 : formule brute : C₁₇H₁₂O₇
Masse molaire : 328,3 g/mol (AFSSA, 2006).



Figure 5 : Structure moléculaire des aflatoxines AFB1 et AFM1.

III.5. Les trichothécènes :

Les trichothécènes sont des mycotoxines très répandues dans le monde. L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme s'effectue soit par les denrées brutes (Céréales, farines...), soit par des produits élaborés (céréales) mais aussi éventuellement par des produits d'origine animale, si ce dernier a consommé une nourriture contaminée. Les trichothécènes sont toxiques pour l'homme et pour l'animal. Les risques résultant de l'exposition (essentiellement chronique) sont considérés comme un problème majeur en santé publique et en médecine vétérinaire. (Balzer, 2004).

Les trichothécènes constituent un groupe de métabolites secondaires produits par de nombreuses espèces du genre *Fusarium*, en particulier *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* et *F. sporotrichioides*. Plus de 160 trichothécènes ont été identifiés, notamment le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV), la toxine T-2, la toxine HT-2, le diacétoxyscirpénol (DAS) et la fusarénone X (FX). Le trichothécène le plus fréquemment retrouvé est le DON (AFSSA, 2006).

III.5.1. Propriétés physico-chimique:

Les trichothécènes se présentent en général sous la forme de poudres cristallines incolores. Leur poids moléculaire varie de 154 à 697 daltons, mais le plus souvent se situe entre 300 et 600 daltons (IARC, 1983). Ils sont optiquement actifs (lévogyres ou dextrogyres). Les trichothécènes ne présentent pas de pics spécifiques d'absorption dans l'ultraviolet ou le visible, excepté les trichothécènes macrocycliques qui présentent des doubles liaisons conjuguées et absorbent à 260 nm (groupe D) (IPCS, 1990). Tous les trichothécènes absorbent à 228 nm, et bien que non spécifique, cette propriété est utilisée pour leur dosage en chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Le spectre infrarouge est caractérisé par la présence de bandes d'absorption correspondant à la vibration de valence des C = O, C - O des groupes acétyles, des groupements hydroxyles (IARC, 1993). Le spectre de résonance magnétique nucléaire présente les pics caractéristiques de l'époxyde. Le spectre de masse n'offre aucune fragmentation caractéristique.

Les trichothécènes sont des composés neutres. Ils sont généralement solubles dans les solvants modérément polaires tels que les alcools, les solvants chlorés, l'acétate d'éthyle ou l'éther éthylique et parfois légèrement solubles dans l'eau. Les dérivés alcooliques ont une solubilité dans l'eau supérieure à celle des dérivés estérifiés (nivalénol et diacétylnivalénol) et sont plus difficiles à obtenir sous forme cristalline (IPCS, 1990).

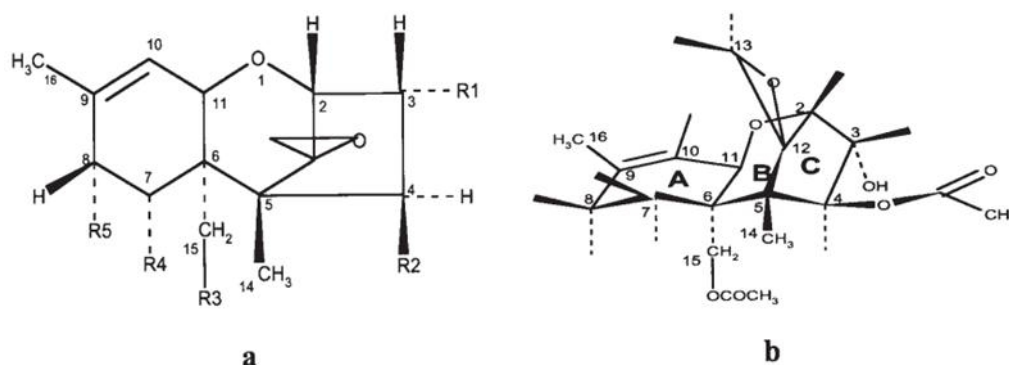


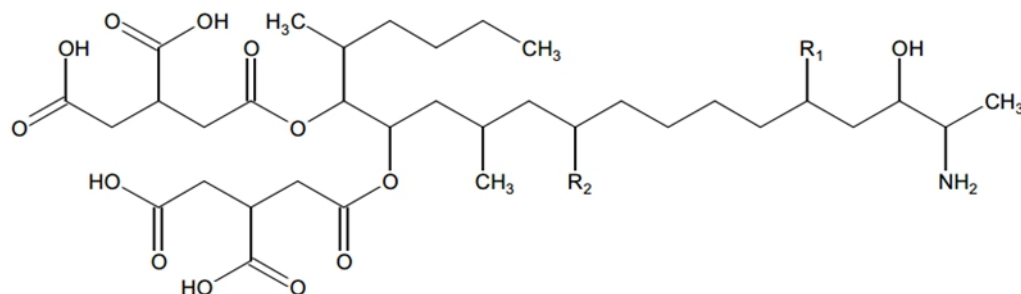
Figure 6 : Structure générale des trichothécènes (a) et (b).

III.6. Les Fumonisines :

Les Fumonisines sont des mycotoxines produits par des champignons du genre *Fusarium* et plus particulièrement *F.moniliforme*. Il existe quatre types de Fumonisines (FA, FC et FP). Sur les 13 sortes de Fumonisines les plus répandues sont les FB1 et FB2, elles sont généralement thermostables (Bouton, 2011).

III.6.1. Propriétés physico-chimiques :

Les Fumonisines constituent un groupe de mycotoxines chimiquement voisines dont la structure est donnée dans la figure suivant.



	R ₁	R ₂	Formule brute	Nombre CAS	Masse Moléc.
Fumonisine B ₁ (FB ₁)	OH	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	116355-83-0	721,838
Fumonisine B ₂ (FB ₂)	OH	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	116355-84-1	705,839
Fumonisine B ₃ (FB ₃)	H	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	136379-59-4	705,839
Fumonisine B ₄ (FB ₄)	H	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	136379-60-7	689,840

Figure 7 : Structures chimiques des Fumonisines. (AFSSA, 2006).

III.7. Les effets toxiques des mycotoxines : L'exposition humaine et animale aux mycotoxines se manifeste essentiellement par ingestion, mais aussi par inhalation ou par contact cutané. Cette exposition est à l'origine de toxicités aiguës, subchroniques et/ou chroniques, en fonction du type de la toxine et de la dose ingérée (Peraica et al. 1999 ; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Les intoxications aiguës sont exceptionnelles et rares en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Toutefois, les intoxications chroniques sont les plus fréquentes en raison d'un effet cumulatif, des habitudes alimentaires et de la rémanence de ces toxines (AFSSA, 2006). Les mycotoxines sont dotées d'un large spectre d'effets toxiques. Certaines toxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines, ochratoxines, fumonisines), d'autres se révèlent néphrotoxiques (ochratoxines, citrinine), neurotoxiques (trichotécènes, patuline), immunotoxiques (aflatoxines, ochratoxines, fumonisines, trichotécènes), hématotoxiques (trichothécènes,) et œstrogéniques (Zéaralénone). De même, les aflatoxines, les fumonisines, la zéaralénone et les ochratoxines sont reconnues être génotoxiques et cancérigènes (Pfohl-Leszkowicz et al, 1995 ; Hussein et Brasel, 2001 ; Bennett & Klich, 2003 ; AFSSA, 2006). Bien que plus de 400 mycotoxines aient été identifiées et répertoriées, seulement une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes pour l'homme. Les plus importantes des points de vue agro-alimentaire et sanitaire et faisant l'objet d'une surveillance régulière sont les

aflatoxines, les ochratoxines, la zéaralénone, les fumonisines, la citrinine, la patuline, les trichothécènes et aussi le déoxynivalénol (Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 2002).

III.8. Méthodes de détection des mycotoxines

Dans les aliments, dans un cadre de de contrôle réglementaire. Exige des méthodes de dosage aux performances analytiques reconnues. Or, la préparation de l'échantillon est une partie importante d'analyses (Benmansour, 2005)

L'analyse des mycotoxines, comme tout contaminant des aliments nécessite la combinaison des techniques d'extraction, purification, concentration et les techniques de séparation et détection qualitative et quantitative, elle est actuellement basée sur des dosages physico-chimiques (Dragacci, 2006).

III.8.1. Chromatographie sur couche mince :

Chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode encore largement utilisé pour des mesures quantitatives et semi-quantitatives de mycotoxines avec détection par fluorodensitométrie ou procédures visuelles (limite de détection de 0,01 ppm). Chromatographie sur couche mince à base de gel de silice, gel de silice F254 fluorescente ou d'un gel de silice imprégné d'acide organique a été rapporté à appliquer pour la détection des mycotoxines communes (aflatoxines, la citrinine, les fumonisines) (Lin ,1998).

III.8.2. Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) :

Les méthodes de chromatographie Gazeuse couplée aux détecteurs a Ionisation de flamme (flamme ionisation detector [FID]), électron capture Detector (ECD) et spectrométrie de Masse (MS) étaient les méthodes les Plus couramment employé es pour la Détermination quantitative simultanée des trichothécènes dans les céréales et les produits dérivés. La chromatographie gazeuse couplée à un détecteur MS (GC/MS) offre l'avantage de la confirmation de l'identité des pics chromatographiques et peut être aussi utilisé e pour détecter plusieurs mycotoxines simultanément (Tanaka et al, 2000).

III.8.3. Chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C) :

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est largement acceptée comme une méthode officielle pour la détermination des toxines. Il est appliqué en conjonction avec les UV, la fluorescence, la détection ampérométrique ou spectrofluorimétrie. (Jiménez et *al*, 2000).

III.8.4. Méthodes immunochimiques :

Les tests immunochimiques sont basés sur les interactions entre les anticorps et les antigènes que constituent les mycotoxines. Les anticorps doivent être très fortement spécifiques pour identifier les composés structurellement très différents. Les analyses immunochimiques telles que l'enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) sont devenues très populaires dans le criblage de mycotoxines (Zheng et *al*, 2006). Plusieurs études ont développé et utilisé les méthodes immunochimiques pour l'analyse des trichothécènes, l'ochratoxine A, la zéaralénone et la fumonisine B1 dans les céréales (Krska et *al*, 2001).

III.9. Méthodes de décontamination:

Certaines souches des bactéries et levures possèdent des structures parétales capables de se lier aux mycotoxines et les rendre inactive (Yan et *al*, 2004 ; Palumbo et *al*, 2006).

Certains microorganismes sont capables de métaboliser les mycotoxines ou les bioconvertir en composés plus ou moins toxiques (Nakazato, 1990).

III.10. Prévention et les procédés de décontamination :

La prévention et la lutte contre les champignons et leurs mycotoxines s'effectuent à trois niveaux :

a) Au champ

La prévention au champ se résume à l'utilisation raisonnée d'insecticides et des fongicides (Hell et *al*, 2000). ainsi qu'à respect de la rotation des cultures, les dates de semis et de développement de variétés résistantes (Luo et *al*, 2005 ; Garcia et Herdia, 2006)

b) A la récolte :

Le respect des dates de récoltes est recommandé de préférence par temps sec, les grains doivent être suffisamment murs et ne pas être endommagés au cours de la récolte et de pratiques culturales.

c) Au stockage :

Le maintien des lieux de stockage frais, sec et aérés ou l'humidité, l'oxygène et la température doivent être régulièrement en utilisant des systèmes de ventilation. Protocol trouvé que l'application des méthodes de lutte intégrées est efficace pour prévenir le développement d'insecte et d'acariens. Un pré tri avant le stockage doit être effectué car les graines cassées sont beaucoup plus sujettes aux mycotoxines que la graine intacte (Broggi et al, 2002).

III.10. Réglementation :

Plusieurs pays ont établi ou proposé des limites réglementaires concernant les mycotoxines dans les aliments. Depuis 1974, certains pays de l'UE ont arrêté des taux limites d'aflatoxines. En mars 1999, en collaboration avec l'OMS, La FAO a parrainé la 3ème conférence mondiale sur les mycotoxines. La conférence a été organisée pour sensibiliser les décideurs aux risques sanitaires et aux effets économiques potentiels de la contamination des denrées alimentaires et des produits d'alimentation animale, et de promouvoir l'harmonisation des réglementations et les procédures de contrôle et pour recommander des stratégies permettant d'évaluer, de prévenir et de lutter contre la contamination par les mycotoxines. Les pays de l'Union européenne ont édité un règlement CE 98 pour limiter la présence des mycotoxines dans l'alimentation humaine. Ce règlement a été révisé plusieurs fois et chaque année la commission européenne publie ces réglementations d'une manière régulière, le dernier portant le N° CE 1881/2006 date du 19 décembre 2006. (Zendine et al, 2007).

L'établissement des limites maximales est différent d'un pays à une autre. Dans l'UE (l'Union européenne) le niveau maximum de déoxynivalénol (DON) dans les céréales et les produits à base de céréales est de 2 mg/kg, il est proposé dans les grains de céréales brutes (blé, maïs et orge), avec la description qui est rattachée au grain de blé brut, de maïs et d'orge après le retrait des grains altérés. Il est notoire que les procédés de nettoyage et de triage des grains de céréales brutes peuvent réduire de façon conséquente le niveau de contamination par le DON des céréales. La description « après retrait des grains altérés » indique que la limite maximale s'applique au blé brut, au maïs brut, à l'orge brute après que ceux-ci ont subi les procédés de nettoyage et de triage. Si cela en est le cas, l'UE ne peut pas souscrire à la limite maximale proposée de 2mg/kg pour le blé tendre et l'orge et propose une limite maximale de 1,25mg/kg pour le blé tendre brut et l'orge brute (FAO, 2013).

Pour les aflatoxines En fixent les LMR (limite maximale de résidus) dans les produits d'alimentation humaine et de 10µg/Kg pour l'aflatoxine B1 et de 20 µg/Kg pour la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2, pour les fumosine LM proposées de 5000 µg/kg pour le maïs non transformé et 2000 µg/ kg pour la farine/semoule de maïs (FAO,2013).

I. Matériel végétale :

Vingt-six échantillons de grains de céréales à savoir : le blé tendre, le blé dur et le maïs récoltés durant la campagne 2013-2014 provenant de différentes régions céréalières de l'Algérie (tableau 4). Ont été analysés dans le but d'identifier les microflore internes et externes présentent au niveau de chaque échantillon et leur éventuelle contamination en mycotoxines.

Tableau 4 : liste des lots des variétés de blé analysés

Espèce	Nom des variétés	Région géographique	Année de récolte
Blé dur	GTA	Ouad semar	2013
	Semito _{R1}	Ghilizane	2015
	Bousselam	Sétif	2015
	R'immana	Sétif	2015
	Djanete	Sétif	2015
	Vitron	Berrouaghia	2014
	BSLR1AR2013	Bouredjbouariridj	2014
	GTA DVR2NR	Bouredjbouariridj	2014
	Chen's	Bouredjbouariridj	2014
	Vitron	Bouredjbouariridj	2014
	Semito	CCLS	2014
	Semito	El-khemis	2015
	Semito	El-Menia	2015
	GTA	bouredjbouariridj	2015
	Virton _{R1}	Relizane	2015
Blé tendre	ARZ	Ouad semar	2013
	Ain Abid	Relizane	2015
	Hxd 1220	Relizane	2015
	Djemila	Sétif	2015
	Wiffak	Sétif	2015
	MBB	Sétif	2015
	HD1220	Berrouaghia	2014
	ARZ	El-khemis	2014
Maïs	Omnili	El –Menia	2015
	V ₁	El-Menia	2015
	V ₂	Laghouat	2015

II. Méthode d'isolement

Le prélèvement des grains de céréales pour l'analyse a été effectué de façon à être représentatif du lot global dont il est issu. Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la mycoflore totale associée aux semences, c'est pour cette raison nous avons utilisé deux méthodes d'isolement.

II.1. Méthode d'isolement de la mycoflore externe :

L'analyse a porté sur 100 grains pris au hasard de chaque variété, les grains non désinfectés sont déposés sur un milieu nutritif (PDA) à raison de 10 grains par boîte. Les boîtes sont incubées à une température de 25°C.

II.2. Méthode d'isolement de la Mycoflore interne : spécialement les *Fusarium* :

Notre analyse pour la mycoflore interne dans cette étude s'est focalisée sur la recherche des espèces de *Fusarium*.

Les manipulations décrites sont à réaliser de préférence en atmosphère stérile Après leur désinfection de surface : Au minimum, 100 grains (ou 60) seront analysés pour la détection et l'identification des différentes espèces de *Fusarium spp.*

L'objectif de la stérilisation de surface des grains est d'éliminer toutes les pollutions externes d'origines fongique ou bactérienne. Pour l'analyse de céréales à petits grains : 50 ml

De grains sont stérilisés en surface, Les grains sont placés dans un panier tamis à maille de 05-1 mm (type "moustiquaire") et suivent le cycle de désinfection suivant :

- 10 min dans un bécher contenant 300 ml d'une solution d'hypochlorite de Sodium à 1.5°C/l additionnée d'un agent mouillant Tween 20 (0.01% V/V) ou savon (Champion, 1996)
- 1min dans un bécher contenant 300 ml d'eau stérile (opération effectuée 3 fois de suite).
- Le panier contenant les grains est ensuite égoutté et les grains sont placés à sécher sur du papier filtre stérile

Après désinfection les grains sont placés à l'aide d'une pince stérile dans des boîtes de pétri de 90 mm coulées avec le milieu DCPA (voir annexe) à raison de dix grains par boîte, Les boîtes de pétri DCPA sont incubées dans l'étuve à une température de 25°C pendant 10 jours. Après 10-12 d'incubation, les *Fusarium sp.* Infectant les grains se sont bien développés sur le milieu semi sélectif DCPA. Ce dernier ne permet pratiquement aucune pigmentation du thalle des champignons qui s'y développent. Les cultures apparaissent donc généralement blanches à rose

très pâle. Le milieu étant semi sélectif, seuls les champignons du genre, *Fusarium* vont se développer de manière conséquente sur le milieu (vitesse de croissance radiale >2 mm / jour et mycélium aérien abondant). Les autres genres de champignons peuvent croître mais vont présenter une vitesse de croissance radiale relativement faible (<2 mm / jour) et un mycélium aérien très peu abondant voire inexistant. De plus, il a été montré que ce milieu était significativement plus efficace que le milieu PDA pour la détection des *Fusarium*

II.3. Calcul de la fréquence et l'abondance des espèces fongiques :

Pour évaluer les taux de contamination des grains de maïs et blé par tous les contaminants confondus nous avons calculé la fréquence Et l'abondance

La fréquence : nous renseigne sur le nombre de fois que le champignon est présent dans les lots de semences analysés. Elle est calculée par le rapport.

Nombre de lots présentant le champignon / Nombre total de lots analysée.

L'abondance : est déterminée par le nombre total des individus de chaque espèce dans l'échantillon total, (Bounar, 2009).

II.4. Méthodes de Purification

II.4.1. Repiquage successif :

Consiste à faire deux repiquages successifs au maximum des isolats sur milieu PDA, pour l'obtention d'une culture pure. (Botton et al, 1990), il rajouté la méthode de culture monospore

II.5. Méthode de conservation :

Une que les champignons sont purifiés, nous avons fait la conservation les tubes sur des milieux courants le milieu PDA, (Botton et al, 1990). Il est prudent d'utiliser un système rationnel d'étiquetage de façon à ce que chaque isolat, tout en étant désigné par un minimum de signes, puisse être identifié sans ambiguïté (Davet et al, 1997).

Toutes les géloses inclinées ont été incubées à température ambiante pendant 7 jours et conservé à 4 ± 1 ° C, (Bensmira, 2006). Les souches doivent être repiquées tous les 8 à 10 mois, (Botton et al, 1990).

II.6. Identification et Description des caractères morphologiques et microscopiques :

II.6.1. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant. Pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998). Les genres de moisissures sont ainsi identifiés sur la base des caractéristiques morphologiques et microscopiques et à l'aide des différentes clés de détermination (Botton et al, 1990) et (Barnet et Hunter., 1999) et (Pitt et Hocking, 2009).

Pour la détermination morphologique et l'identification de l'espèce d'un isolat de *Fusarium* sp nous nous sommes basés sur la clé de de Leslie et al, 2006.

II.6.2. Critères d'identification macroscopique :

- L'aspect des colonies : représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien). Le relief des colonies il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).
- La taille des colonies : Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).
- La couleur des colonies : est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Alternaria*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).
- Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de *Fusarium*.

II.7. Analyses mycotoxiques :

Notre choix s'est porté sur trois genre différent model pour l'étude du potentiel toxinogénèse, il s'agit des isolats ou de *Fusarium* et les isolats d'*Aspergillus*.et *penicillium*. Les méthodes chimiques d'extraction et de purification des mycotoxines, utilisant une étape de l'extraction (liquide/liquide ou bien solide/Liquide), suivie d'une étape de purification de l'extrait, et d'une étape de concentration ou condensation et puis l'étape De détection par chromatographie

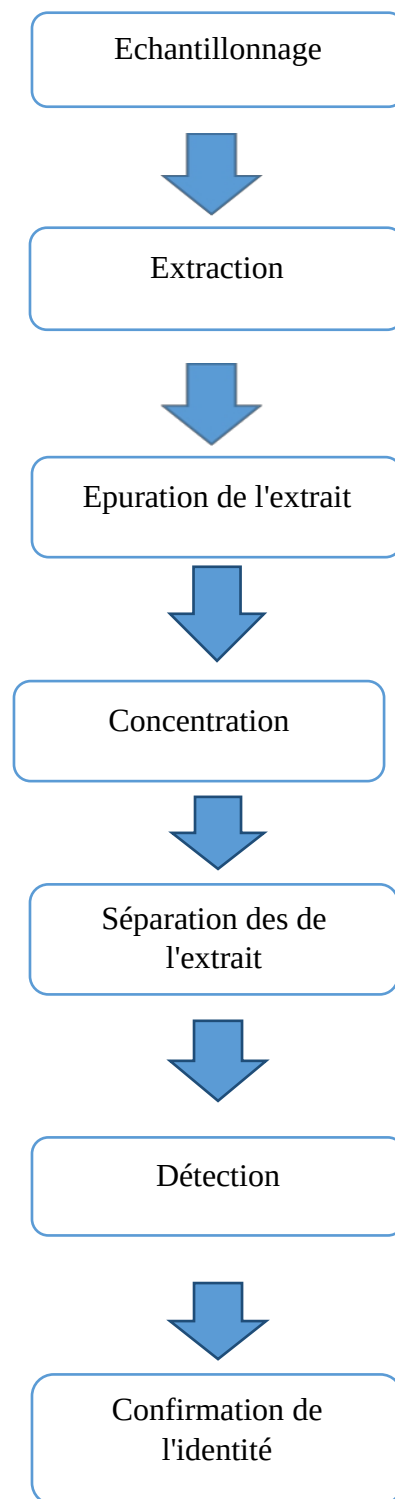


Figure 8 : Procédure d'analyse pour le dosage des mycotoxines (FAO, 1992).

II.7.1. Extraction et purification à partir du milieu de culture liquide (extraction liquide/liquide) :

Pour tester le pouvoir de productivité des aflatoxines et Ochratoxine nous avons inoculé aseptiquement les neuf isolats d'*Aspergillus*, et *Penicillium* dans un 50 ml du milieu semi synthétique YES (Davis et al, 1966) dans des flacons de 250 ml stérile, après une période d'incubation de 14 jours à 25°C, Les milieux de cultures ont été filtrés à travers papiers Wattman, après récupération du filtrat, 50 ml de chaque échantillon a été additionnées à 50 ml de chloroforme après agitation énergétique pendant 10 min, ensuite la séparation de la phase aqueuse de et la phase chloroformique été faite à l'aide d'une ampoule décanter.

La phase aqueuse est extraite encore une fois, on additionné 25ml de chloroforme, et pendant 5 min, du chloroforme à la phase aqueuse récupérée chaque fois.

Le milieu Y.E.S est le meilleur pour la sécrétion de l'Aflatoxine et l'Ochratoxine par *Aspergillus Aflatoxinogènes*. (Davis et al, 1956).

La phase chloroformique ainsi obtenue est filtrée puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur à 40°C. L'extrait sec a été récupéré par rinçage des parois du ballon avec 1 ml du chloroforme et ensuite conservé au réfrigérateur à l'abri de lumière, jusqu'à son utilisation (figure 9).

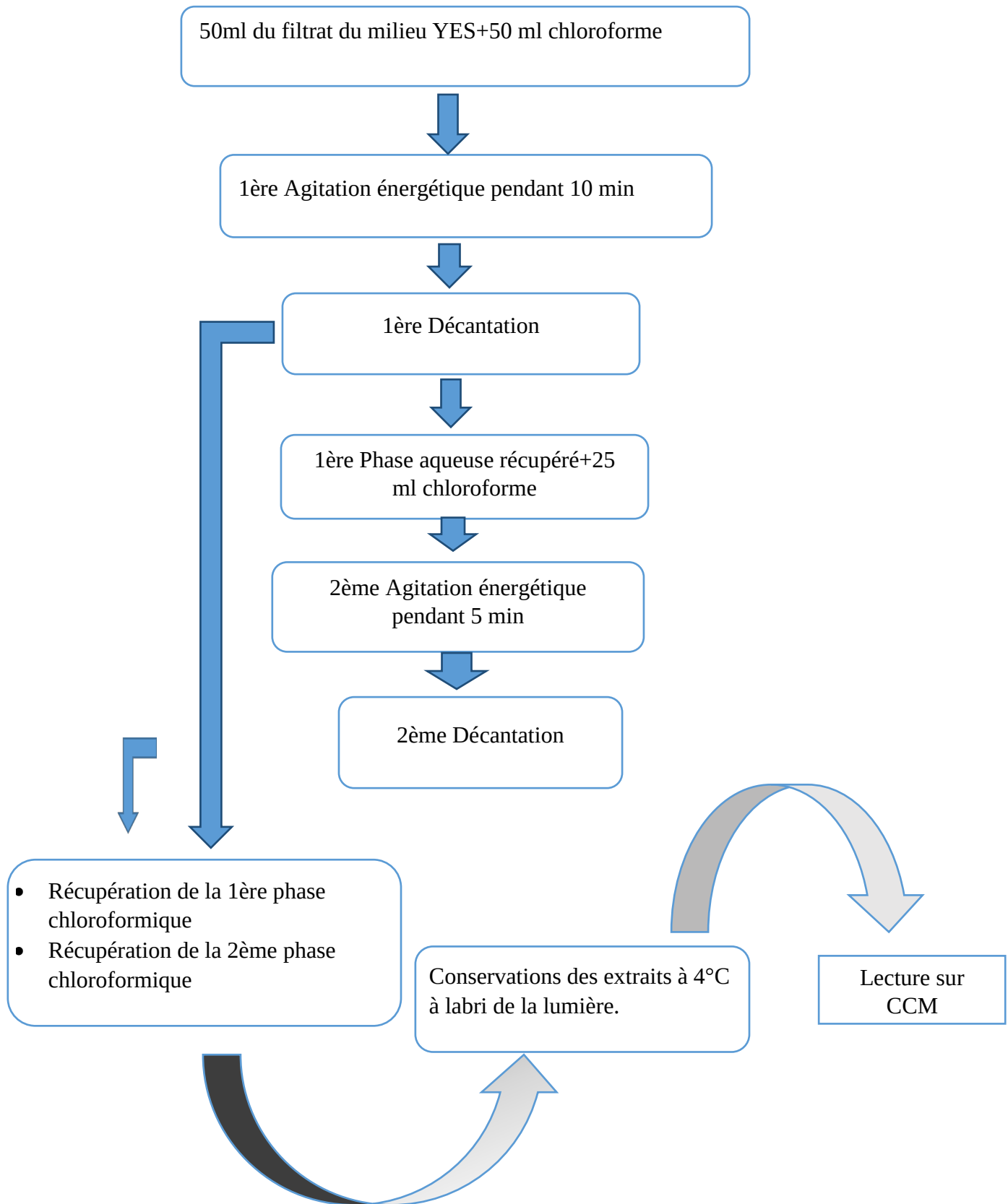


Figure 9 : Diagramme d'extraction et purification du mycotoxine à partir du milieu de culture liquide selon Davis et al. (1966).

II.7.2. Détection du potentiel toxigène des isolats de *Fusarium* :

II.7.3. Mise en culture des isolats de *Fusarium* pour la production des spores en milieu liquide CMC

Le milieu liquide CMC, est utilisé pour donner une meilleure sporulation des *Fusarium*. les cultures standard sont réalisées en flacons contenant 100 ml de milieu de culture liquide inoculé avec des explants de 6 mm de diamètre, prélevé d'une colonie pure de chaque isolats âgés de 12 jours. Les flacons hermétiquement fermé. Sont incubés à 25°C. pendant 7 jours.

II.7.4. Milieu synthétique pour les mycotoxines :

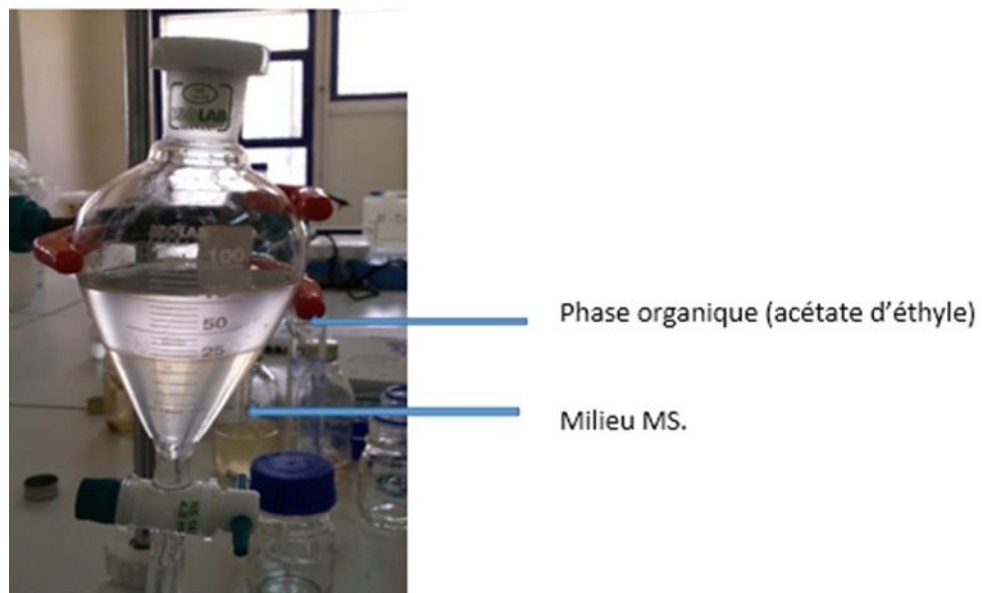
Pour obtenir une meilleure production des mycotoxines nous avons utilisé le milieu de culture liquide MS :

«Mycotoxine Synthetic Medium ».pour la préparation du milieu il faut tout d'abord dissoudre le glucose dans un l'eau distillé puis autoclave 30 min a 105°C. puis les différents solutions des autres constituants sont additionnées stérilement. Les 100 ml de filtrat CMC sont additionnés à 100 ml de de SM dans des conditions stérile. Puis incubés à 25° C pendant 15 ours pour la production des mycotoxines.

II.7.5. Extraction et purification des trichothécènes « TCTB » à partir du milieu de culture liquide MS :

Pour l'extraction, 50 ml d'acétate d'éthyle sont ajouté à 25 ml de milieu MS. On vortex pendant 1 min. Après décentration (30min-1h) jusqu'à l'apparition des deux phases,

Toute la quantité du surnageant est prélevé pour être évaporé à l'aide d'un rotavapeur. De 45°C L'extrait sec est repris avec 1 ml de méthanol/eau (0.5/0.5,v/v).



(ORIGINALE,2016).

Figure 10 :Separation les deux phases

III. Chromatographie sur couches mince monodimensionnelle (CCM)

III.1. Principe :

La phase mobile (phase liquide) est un solvant ou un mélange de solvants choisi en considérant les propriétés de l'échantillon à analyser, alors que la phase solide est généralement un adsorbant (gel de silice) maintenu sur une chromatoplaque, soit en plastique rigide ou en métal.

III.2. Technique pour l'identification potentielle toxogènes des isolats d'Aflatoxines et Ochratoxines :

Notre choix s'est porté sur la chromatographie sur couche mince monodimensionnelle. Celle-ci réalisée sur une plaque de CCM prêtes à l'emploi comportant déjà une couche de 0.25 mm de silicagel. Tout d'abord la plaque a été activée dans une étuve à 110°C. Après refroidissement la plaque a été spottée immédiatement où nous avons déposé les 8 spot de 20 µl de chaque extrait à analyser. Les taches des solutions sont déposées à 1.5 cm du bord inférieur et à des intervalles de 1.5 cm. la taille des taches doit être réduite, uniforme et ne dépassant pas les 0.5 cm de diamètre. la distance de migration est 15 cm (Randerath, 1971) de chaque échantillon, les spots sont déposés en superposition à l'aide des tubes capillaires sur le même point. Un séchage au sèche-cheveu est nécessaire entre chaque dépôt. la plaque se placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'élution constitué de toluène, acétate d'éthyle et acide formique de volume de (6/3/1) respectivement.

III.3. Technique pour l'identification potentielle toxogènes des isolats des trichothécènes B :

Pour déterminer le type de trichothécène produit et identifier les chémotype DON et NIV, 8 isolats de *Fusarium* analysés par CCM.

Celle-ci a été réalisée en utilisant des plaques de CCM prêtes à l'emploi comportant déjà une couche de 0.25 mm de gel de silice (Trucksess, 1984 et IPCS, 1990).

La plaque est placée dans la cuve à revoir doit être contenir de 10 ml de notre solvant d'acétate d'éthyle et hexane (8/2), on évite tout contact entre le dépôt ponctuel et le solvant. nous avons utilisé un révélateur, Chlorure d'Aluminium.

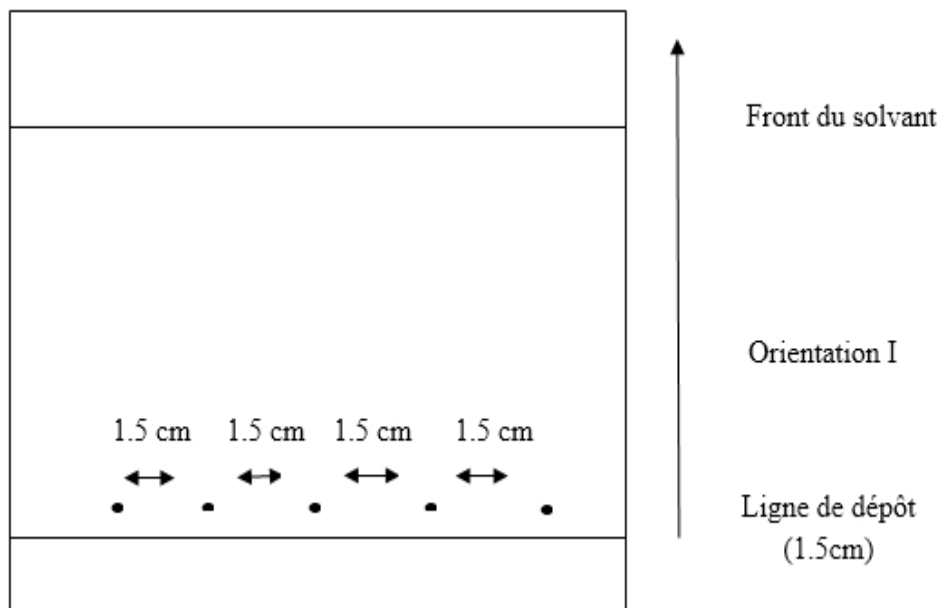


Figure 11: CCM monodimensionnelle.

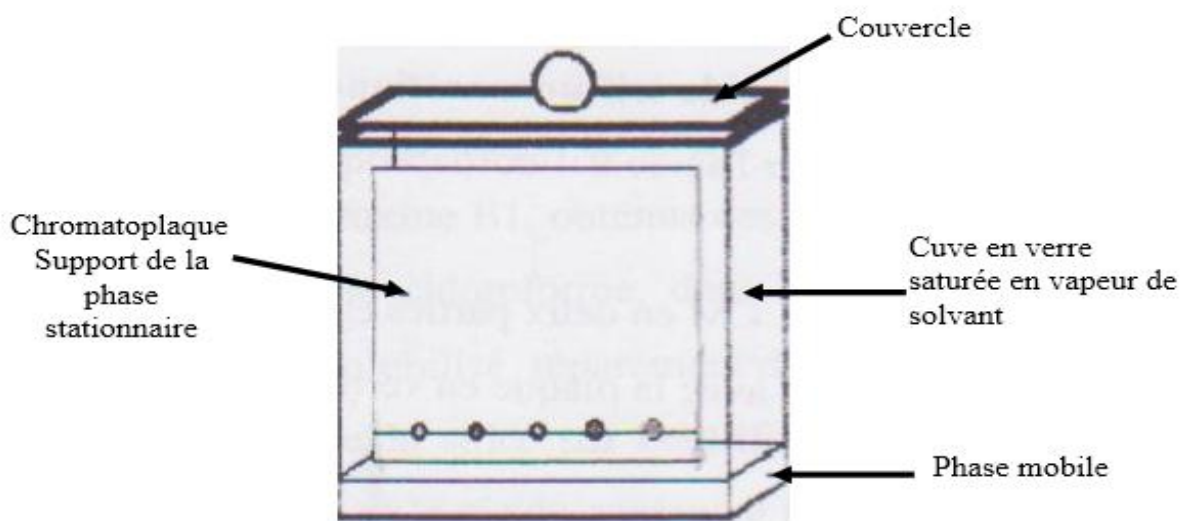


Figure 12: Cuve de développement

IV. Révélation des de plaque chromatographique :

IV.1. Principe :

Le principe de la revelation repose sur la fluorescence des mycotoxines UV et sur la comparaison des rapports frontaux (RF) des spots des extraits avec la migration de chaque une.

IV.2. Technique de révélation :

Cela consiste a pulvériser les plaques avec la solution révélatrices telle que :

Lachlorure d'aliminuim ($AlCl_3$) est utilisé pour l'identification toxinoène des espèces *Fusarium* . pour l'aflatoxine UV est de 368 .pour la lecture des TCTB nous avons utilisé des UV aux longueurs d'onde 368 de Le rapports frontal est la distance parcourure par la mycotoxine recherchée sur la distance parcourure par le solvant. (H). $RF=h/H$.

I. Isolements et identification de la mycoflore totale associée aux semences :

La recherche de la mycoflore totale concerne l'ensemble des champignons présents au niveau des semences. A cet effet des isolements ont été effectués sur des semences entières désinfectées et non désinfectées.

Après 7 jrs d'incubation, les *Fusarium sp* et les autres contaminants infectant les grains se sont bien développés sur les deux milieux DCPA et PDA.

Les isolements des champignons existants dans les échantillons collectés ont révélé la présence de deux catégories de champignons :

- ✓ Les espèces saprophytes telles que : *Alternaria sp*, *Rhizopus sp*, *Aspergillus*, *penicillium*,.....etc., elles sont généralement responsable des dégâts durant le stockage.
- ✓ Pour les *Fusarium* plusieurs espèces ont pu être détectés se sont des pathogènes de champ, elles provoquent des dégâts importants sur l'épi et peut causer des fontes de semis.

I.1. Identification de la mycoflore externe isolée :

Les résultats de l'analyse sanitaire des variétés de blé et maïs analysées ont révélé la présence au niveau externe d'une mycoflore diversifiée.

Les différents champignons isolés sont très variables, où plusieurs genres ont été identifiés : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Colletrotrichum* (tableau 05).

Tableau 05 : Evaluation du taux de contamination des semences par la mycoflore externe.

Culture	Variété	Région	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Colletotrichum</i>	Totale
Blé dur	GTA	Ouad Semar	40	10	2	1		53
	Virton R1	Relizane	30					30
	Semito R1		21	5	3			29
	Vitron	Berroighia	41	13	17			71
	R'immana	Sétif	14	8	5			27
	Djanete		22	8	2			32
	Bousellam		18	5	6		1	30
	vitron	Bordj-bou arreridj	23	11	6			40
	GTA		23	12	7			42
	BSLR		21	9	5			35
	GTA DVR2NR		50	8	8			66
	chen's		19	9	5			33
	Semito	El-khemis	2	10	3			15
	semito	CCLS	4	2	1			7
	Semito	El-Menia	51	30	7			88
Blé tendre	Ain Abid	Relizane	25	11	7			43
	HXD1220		10	2	2			14
	Wiffak	Sétif	20	8	7			35
	Djamila		11	4				15
	MBB		21	10	3			34
	ARZ	Ouad Semar	15	3				18
	ARZ	El-khemis	13	4				
	HD1220	Berroighia	20	10				30
	Maïs 1	El-Menia						
	Omnili		45	21	9			75
Maïs	Maïs 3	Laghouat	10	3	1	1		15

Les résultats obtenus montrent que le genre *Alternaria* sp est le plus abondant pour tous les échantillons de blé analysés. Une abondance a été notée pour cette espèce au niveau des variétés de blé dur, .Semito, GTA, GTA DVR2NR, et avec un taux de contamination respectivement de 51%,50%.23% par contre une présence moins importante a été observée chez le blé tendre avec un taux de contamination de 20%,13% et 10% pour les variétés de wiffak,ARZ et Hxd1220.

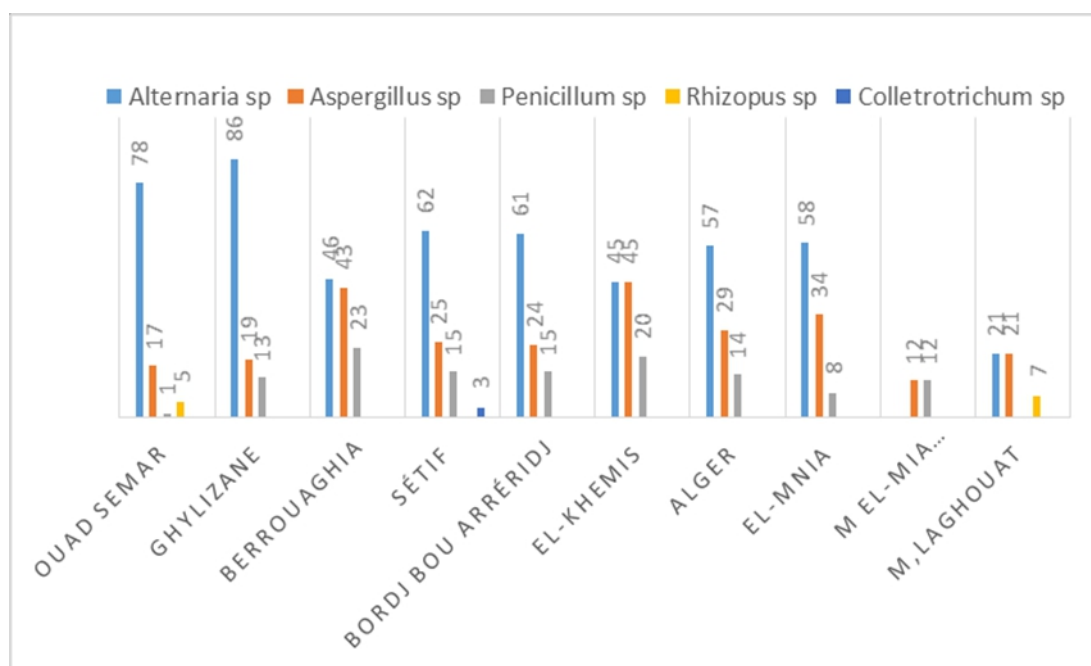


Figure 13 : Présentation des % d'infestations de la mycoflore externe chez le blé et Maïs par région et par variété.

Nous avons remarqué aussi qu'il ya une diversité dans ces taux de contamination par région ainsi nous avons noté des pourcentages élevés de de 86%,78%,62%,61%, respectivement pour les régions de Relizane, Ouad Semar, Sétif et bordj bou arreridj (Figure14) Cependant les régions d'El-Menia, Alger, et Berrouaghia ont montré un taux d'infestation respectivement de 58%,46%.45%. Par ailleurs les 3 variétés de Maïs ont montré une faible contamination par le genre de l'*Alternaria* et nous avons noté un taux de contamination faible de 21%.

Pour les contaminations par le genre *Aspergillus* le taux de contamination le plus élevé était de nous avons noté que les régions d'El-Khemis, Berrouaghia, El-Menia, ont présenté un taux de contamination les plus élevés de 45%,43%,34%.

Le calcul de la fréquence de l'abondance de chaque agent fongique, révèlent que la mycoflore externe est dominée par le genre *Alternaria* pour la totalité des lots analysés avec une abondance de 21 et une fréquence très élevée.

Tableau 06 : L'abondance et les fréquences relatives des espèces isolées (mycoflore interne).

Variétés	Espèces	Abondance	Fréquence
Blé	<i>Alternaria</i>	21	1
	<i>Aspergillus</i>	10	0.9
	<i>Penicillium</i>	6	0.6
	<i>Rhizopus</i>	1	0.04
	<i>Colletotrichum</i>	1	0.04
Maïs	<i>Alternaria</i>	27	0.66
	<i>Aspergillus</i>	12	0.66
	<i>Penicillium</i>	9	0.33
	<i>Rhizopus</i>	1	0.33
	<i>colletotrichum</i>		

I.2. Identification de la mycoflore interne isolée (*Fusarium*) :

La fusariose de l'épi est connue comme l'une des maladies les plus redoutables du blé dans les Régions céréalières humides et subhumides de par le monde (McMullen et *al*, 1997 ; Gilchrist et Dubin, 2002). La fusariose de l'épi a des effets néfastes sur le rendement et la qualité du blé. Par ailleurs, les dégâts les plus redoutables résident dans la production de mycotoxines par les espèces fongiques responsables de la fusariose de l'épi dans les grains attaqués. Plusieurs espèces fongiques, notamment de *Fusarium* et *Microdochium*, peuvent être impliquées dans la maladie et la prédominance de chacune des espèces varie en fonction des années, des régions et même des parcelles (Smiley, 2002). L'identification de l'espèce impliquée est nécessaire pour un meilleur contrôle de la maladie.

Tableau 07 : Evaluation du taux de contamination des semences par la mycoflore

Variété	Région	Nombre des graines contaminées par le <i>Fusarium</i> /100 GA	Autre contamination	Semences saines
GTA	Oued Semar	77	21	1
ARZ		81	18	1
Ain Abid	Relizane	55	44	1
Virton R1		70	30	0
Semito R1		71	29	0
Hxd 1220		85	14	1
vitron	Berrouaghia	28	71	1
HD 1220		0	100	0
bousselam	Sétif	71	28	1
R'immana		74	25	1
Wiffak		66	33	1
Djamila		85	14	1
Djanete		68	31	1
MBB		66	33	1
vitron	Bouredjbou-arréridj	60	39	1
GTA		57	42	1
BSLR		65	34	1
GTA DVR2NR		33	66	1
chen's		66	33	1
Semito	El-khemis	6	60	3
ARZ		82	17	1
semito	CCLS	63	36	1
Semito	El-Menia	85	85	1
Maïs 1		100	0	0
Omnili		26	73	1
Maïs 3	Laghouat	43	6	1

D'après le résultat nous avons obtenu le *Fusarium* est dominants dans la région d'El-Menia, Alger, Setif et Bouredj-bouarriridj avec un taux de contamination de 85%,(82%,81%,66%) par contre il faible dans la région de Berrouaghia avec un taux de contamination de 28%.pour la variété de Maïs le *Fusarium* est dominant la région de El-Menia et Laghouat avec a taux de 100%,43%.

Tableau 08 : abondance et niveau d'infestation des espèces *Fusarium* isolés partir des échantillons de blé et maïs selon la région de récolte

Région géographique	Année de récolte	Blé dur	B t	maïs	>0% à <15%	15% >à <30%	>30% à <50%	>50%
Oud Semar	2013	1	1					2
El-kehmis	2014		2					2
bouredjbouariridj	2014	4	1				1	4
Berrouaghia	2014	1	1		1	1		
Alger	2014	1			1			
Relizane	2015	1	3					4
El-Menia	2015	1		2		1		2
Sétif	2015	4	2					4
Laghouat	2015			1				1

Les résultats ont montré que 90% des grains analysés collectés des différentes régions, ont été infestées par les espèces des genres *Microdochium nivale* *Fusarium culmorum* et L'identification morphologique a montré la présence des espèces fongiques à savoir *M. nivale*, *F.culmorum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, , *F.pseudograminearum* et *F. avenaceum* (L'analyse de ces résultats a montré aussi que *M. nivale* et l'espèce *F. culmorum* étaient les espèces les plus dominantes représentant 40% des espèces isolées. Les fréquences relatives de chacune des espèces identifiées dans le tableau 09.

Tableau 09 : Fréquence d'isolement des espèces de *Fusarium* à partir des grains infestés

Espèces	Espèce	Abondance	Fréquence
Blé	<i>Fusarium culmorum</i>	16	1
	<i>Microdochium Nivale</i>	18	1
	<i>Fusarium tricinctum</i>	12	0.4
	<i>Fusarium poae</i>	13	0.5
Maïs	<i>Fusarium culmorum</i>	17	1
	<i>Microdochium nivale</i>	20	1
	<i>Fusarium tricinctum</i>	6	0.4
	<i>Fusarium poae</i>	11	0.8

I.3.Discussion :

D'après les résultats de l'analyse des semences de blé et maïs, la variété semito de El-Menia porte un taux de contamination de la mycoflore interne et externe élevées avec un pourcentage de 86 % concernant le maïs les variétés d'El-Menia le taux de contamination est de 50%.

La flore fongique mise en évidence dans nos différents lots analysés est comparable à celle identifiées sur les semences du Blé et Maïs depuis des années par plusieurs chercheurs notamment (Levi et al, 1974 ; Tsubouchi et al, 1984 ; Micco et al, 1989; Studer-Rohr et al, 1995) et (Pitt et Hocking., 2009) c'est une mycoflore diversifiée que nous avons classée en deux catégories : mycoflore du champ et mycoflore de stockage, Nos résultats sont en accord avec eux qui montrent que dans tous les lots analysés, les agents saprophytes sont prédominants par rapports aux agents pathogènes.

Les résultats de la recherche des *Fusarium* au niveau des grains et Maïs récoltés de différents étages bioclimatiques de l'Algérie ainsi que de l'identification des espèces fongiques associées à cette maladie ont montré que les *Fusarium* ont été isolés d'une manière fréquente des échantillons prévenant du nord du pays à la faveur des conditions climatiques favorables. En effet, les facteurs climatiques sont connus comme déterminants pour la manifestation de la fusariose de l'épi (Langseth et al, 1995). D'après Franc et al. (1999), l'humidité relative détermine la sévérité et l'intensité de la maladie, alors que la pluviométrie et la température influencent la quantité d'inoculum. L'identification morphologique des espèces fongiques isolées des grains de blé et maïs contaminés a été basée sur différents critères morphologiques proposés par Burgess et al. (1994) et lesellie (2006).

L'identification morphologique a permis de montrer l'implication de 1 espèce à savoir *M.nivale*,*F.culmorum*,*F.pseudograminearum*,*F.verticelloides*,*F.avenaceum*,*F.tricinctum*,*F.sporotrichoides*,*F.solani*,*F.armenacum*,*F.Poa*,*F.circinatum*,*F.semiticum*. Les identifications morphologique des espèces isolées à partir des graines infectées ont montré que *Fusarium culmorum* Et *M. nivale* est l'espèce la plus fréquente (60%) et elle a été isolée à partir de presque 90% des échantillons infestés suivi de *F.culmorum*. Cette fréquence est inattendue puisque cette espèce est particulièrement répandue dans les régions tempérées fraîches comme le Nord-Ouest de l'Europe (Parry et al. 1995 ; Xu et al. 2005). Les interactions compétitives entre *Fusarium* sp. et *M. nivale* pourraient être aussi une des explications de cette haute fréquence. En effet, une étude ultérieure a montré que *Fusarium* sp a été marginalement supprimé par *M. nivale* (Simpson et al. 2004). Ce résultat devrait être pris en compte particulièrement en choisissant les fongicides appropriés pour la désinfection des semences. En ce qui concerne l'espèce *F. culmorum*, Le pouvoir pathogène des isolats ne semble pas être influencé par l'origine des souches (collet, épis). La compétitivité des espèces fongiques au niveau de l'épi détermine le spectre et la fréquence des espèces présentes. *F.culmorum* semble être négativement influencé par la présence de *M. nivale* (Simpson et al. 2004). Plusieurs facteurs pourraient contribuer à cette diminution de fréquence à savoir les conditions environnementales, les pratiques culturales et les traitements par les fongicide Cette étude a montré l'émergence de la fusariose de au Nord L'Algérie et dans les champs de blé irrigués dans le Sud durant l'année 2014/2015.

II. Identification des différents isolats obtenus

Nous avons identifié les différents champignons isolés en se basant sur la détermination morphologique de l'espèce d'un isolat qui repose sur l'observation de nombreuses caractéristiques anamorphiques sur des milieux de culture bien définis, deux clés d'identification ont été utilisées il s'agit de la clé de Leslie et al. (2006) et celle de Barnett (1999) tableau 10.

Tableau 10 : Liste des espèces obtenues de mycoflore interne et externe

mycoflore	Code	Source d'isolement	Origine	Variété	Espèces fongique
Interne	Iso 1	Grain de blé dur	Ouad Semar	GTA	<i>Fusarium culmorum</i>
	Iso 2	Grain de blé dur	El-Menia	Semito	<i>Fusarium armeniacum</i>
	Iso 3	Grain de blé dur	El-Khemis	Semito	<i>Fusarium Poae</i>
	Iso 4	Grain de blé tendre	Sétif	Djanete	<i>Michrosochium nivale</i>
	Iso 5	Grain de blé dur	Berrouaghia	Vitron	<i>Fusarium solani</i>
	Iso 6	Grain de blé tendre	Sétif	Wiffak	<i>Fusarium poae</i>
	Iso 7	Grain de blé	Berrouaghia	Vitron	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
	Iso 8	Grain de maïs	Laghout		<i>Fusarium pseudograminearum</i>
	Iso 9	Grain de blé dur	Setif	Bousselam	<i>Fusarium circinatum</i>
	Iso 10	Grain de maïs	El-Menia		<i>Fusarium .semitectum</i>
	Iso 11	Grain de maïs	El-Menia	Omnili	<i>Fusarium tricinctum</i>
	Iso 12	Grain de maïs	El-Menia	Omnili	<i>Fusarium tricinctum</i>
	Iso 13	Grain de maïs	El-Menia	Omnili	<i>Fusarium solani</i>
	Iso 14	Grain de maïs	El-Menia	Omnili	<i>Fusarium tricinctum</i>
	Iso 15	Grain de maïs	El-Menia		<i>Fusarium verticelloides</i>
	Iso 16	Grain de maïs	El-Menia	Omnili	<i>Fusarium culmorum</i>
	Iso 17	Grain de maïs	El-Menia		<i>Fusarium Solani</i>
Externe	Iso 18	Grain de blé dur	Sétif	Busselam	<i>Alternaria tenuis</i>
	Iso 19	Grain de blé dur	Ouad Semar	GTA	<i>Alternaria consortiale</i>
	Iso 20	Grain de blé dur	El-Menia	Semito	<i>Alternaria consortiale</i>
	Iso 21	Grain de blé dur	Relizane	Semito	<i>Penicillium sp</i>
	Iso 22	Grain de blé dur	Berrouaghia	Hd 1220	<i>Penicillium sp</i>
	Iso 23	Grain de blé tendre	Ouad Semar	ARZ	<i>Penicillium sp</i>
	Iso 24	Grain de maïs	El-Menia	Omnili	<i>Aspergillus sp</i>
	Iso 25	Grain de blé dur	CCLS	Semito	<i>Aspergillus flvaus</i>
	Iso 26	Grain de blé tendre	Relizane	Ain Abid	<i>Aspergillus niger</i>
	Iso 27	Grain de blé dur	Sétif	Bousselam	<i>Colletotrichum</i>
	Iso 28	Grain de blé dur	Ouad Semar	GTA	<i>Rhizopus sp</i>

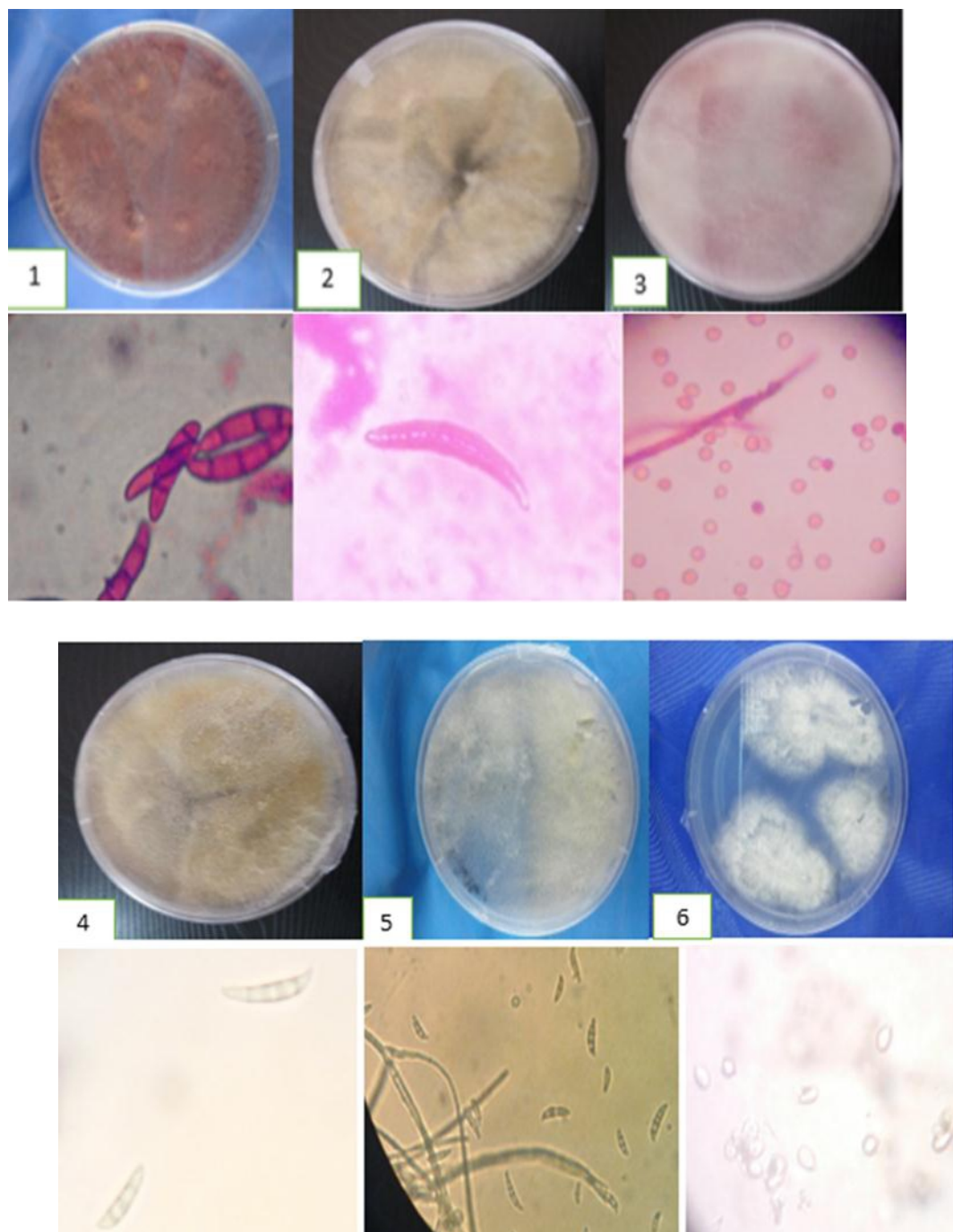


Figure 14 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de *Fusarium* obtenue, Aspect morphologique et microscopique (G x 40) des colonies de la mycoflore interne isolées à partir des grains de blé et Maïs : (1) colonie de *F.culmorum* ;(2) colonie de *F.armeniicum* ;(3) et (6) colonie de *F.poeae* (4) colonie de *Microdochium nivale* ; (5) colonie de *F.solani*

Isolats N°1, N°16, *Fusarium culmorum*

Classe : Adenomycetes

Ordre : Monilales

Famille : tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères culturels : cette moisissure pousse sur PDA. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanche puis à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre.

Morphologie microscopique : les phialides, courtes et large, formées sur mycélium aérien, sont groupées en sporodochies, les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées. Les conidies sont globuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (9-14µm de diamètre)

Isolats N°2, *Fusarium armeniacum*

Classe : Adnomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères culturels, Cette espèce est relativement sa croissance rapide et produit abondant mycélium blanc. Développer des sporodochies abricot à rouge-orange dans le centre de la culture en position centrale bien visible la masse des spores. Sporodochies peuvent devenir brun avec l'âge. *F. armeniacum* produit divers pigments allant de l'orange vif à rouge et brun-rougeâtre en couleurs dans la gélose. Cette espèce se transforme facilement à la forme notales

Isolats N°3, N°6, *Fusarium poae* :

Classe : Adenomycetes

Ordre : monilales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères culturels : cet isolat des colonies a mycélium aérien duveteux de couleur blanc, rouge dans sa partie aérienne et devient rose au contact de l'agar. Les préparations microscopiques montrent la présence de macro conidies, d'une taille moyenne à grande a une forme de faucille. la face dorsale courbées a une cellule basale très distinctement. Les microconidies sont absentes. Ces caractéristiques. Correspondant à l'espèce *Fusarium poae* selon la clé de Leslie et Summerell (2006)

Isolats N°4, *Microdochium nivale*

Classe : Adnomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères culturels, Ce type de *Fusarium* porte une forme irrégulière dans le milieu PDA, avec des bordures ondulées de vitesse de croissance de 0.78 nm avec une couleur blanc, le mycélium peu abondant. Les macroconidies portent une taille moyenne avec une forme de faucille, les chlamidospores sont abondantes sous forme en chaîne les microconidies sont absentes

Isolats N°5, N°13, N°17 *Fusarium solani*

Classe : Adelomycetes (champignons imparfaites)

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères culturels : Le mycélium est blanc à crème. Les macroconidies sont larges et droites. Les spores ont 5 à 7 cloisons.

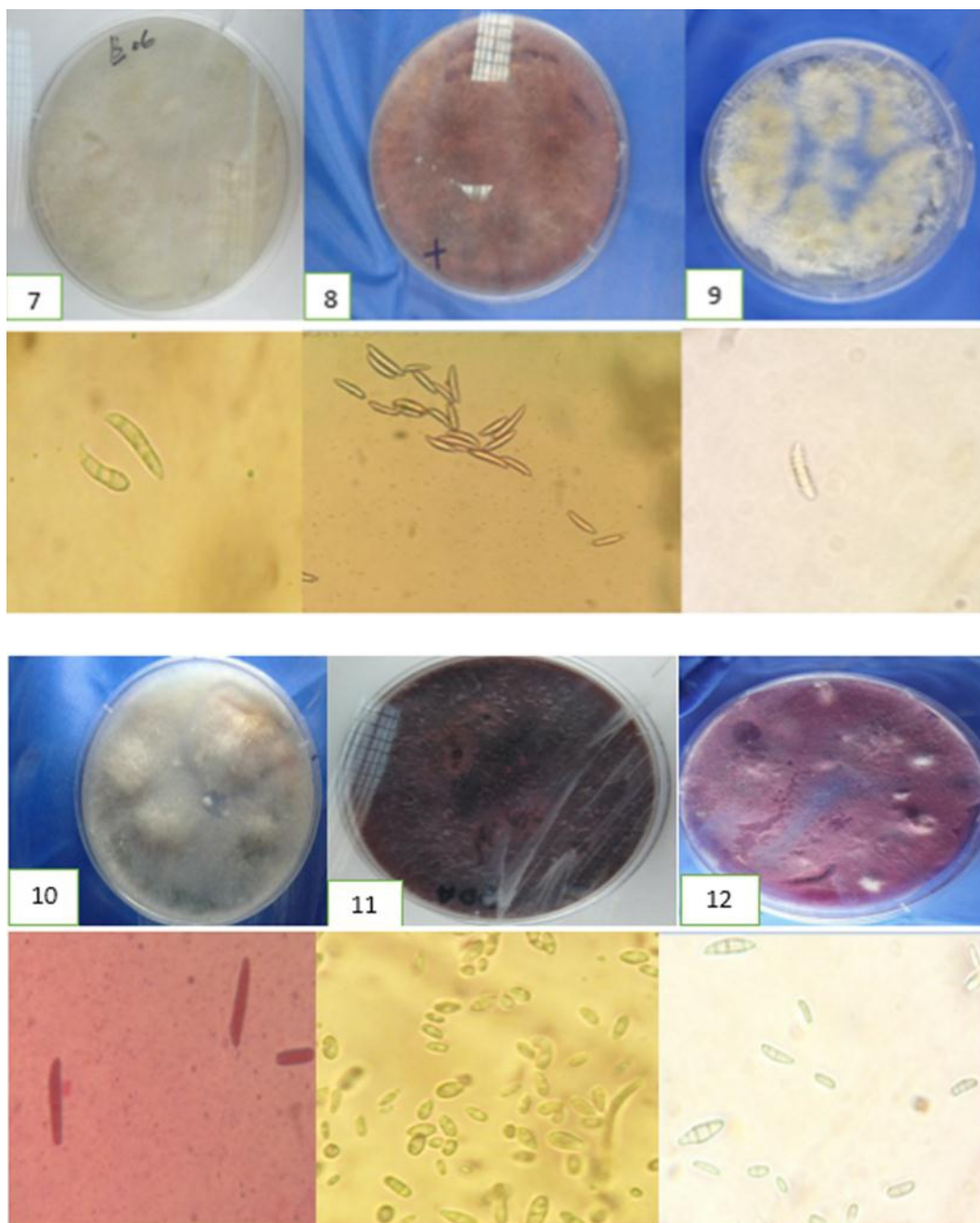


Figure 15 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de *Fusarium* obtenue.

Aspect morphologique et microscopique (G x 40) des colonies de (7) de *F.sporotrichioides* ;(8) colonie du *F.pseudograminearum* ;(9) colonie de *F.circinatum* (10) colonie de *F.semitectum* ;(11), (12) colonie de *F.tricinatum*.

Isolats N°7, *Fusarium Sporotrichioides*.

Classe Adenomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*.

Caractères cultureux : Le *Fusarium sporotrichioides* porte une forme irrégulière avec une bordure ondulée de vitesse 4.72 nm/j. Le mycélium est blanc. Les macroconidies sont porte une taille moyenne de forme de faucille. Les microconidies sont extrêmement abondantes avec un aspect de conidiospore ramifiée ou non ramifiée.

Isolats N°8, *Fusarium pseudograminearum*

Classe : Adenomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères sur PDA. Blanc abondante au jaune au rouge mycélium peut remplir complètement la boîte de Pétri. Des pigments rouges se forment dans la gélose. Les préparations microscopiques montrent la présence des macroconidies effilées, longueur. Elles mesurent (50-80) x (2.5-4) µm, et possèdent jusqu'à 7 colonies alors que les microconidies absents. Leslie et Summerell (2006).

Isolats N°9, *Fusarium circinatum*.

Classe : Adenomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères sur PDA. Mycélium blanc, mais peut produire le pigment violet dans l'agar. Pousse relativement rapidement. Macroconidies sporodochie : Séparés et peuvent être difficiles à trouver, ils sont généralement sur œillet morceaux de feuilles et sont de couleur orange pâle. Selon la clé de Leslie et Summerell (2006).

Isolat N°10, *Fusarium semitectum*

Classe Adenomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères sur PDA, Les cultures se développent habituellement rapidement et produisent un mycélium aérien dense abondante qui est initialement hors blanc et devient beige ou brun avec l'âge. Marron, les des pigments peuvent également être produits dans l'agar. Orange clair sporodochie peut être produite par certaines souches. , Microconidies sont rares et difficiles à trouver souvent. Leslie et summerll(2006).

Isolats N°11, N°12, N°14 *Fusarium tricinctum*

Classe Adenomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Caractères sur PDA. Mycélium blanc, mais peut produire le pigment violet dans l'agar. Pousse relativement rapidement. Macroconidies sporodochie : Séparés et peuvent être difficiles à trouver, sont de couleur orange pâle. À une taille moyenne, Forme de faucille. Les microconidies est extrêmement abondantes avec une mélange de napiforme. La taille de l'aspect de conidiophore est moyenne. A parois parallèles flexueux.

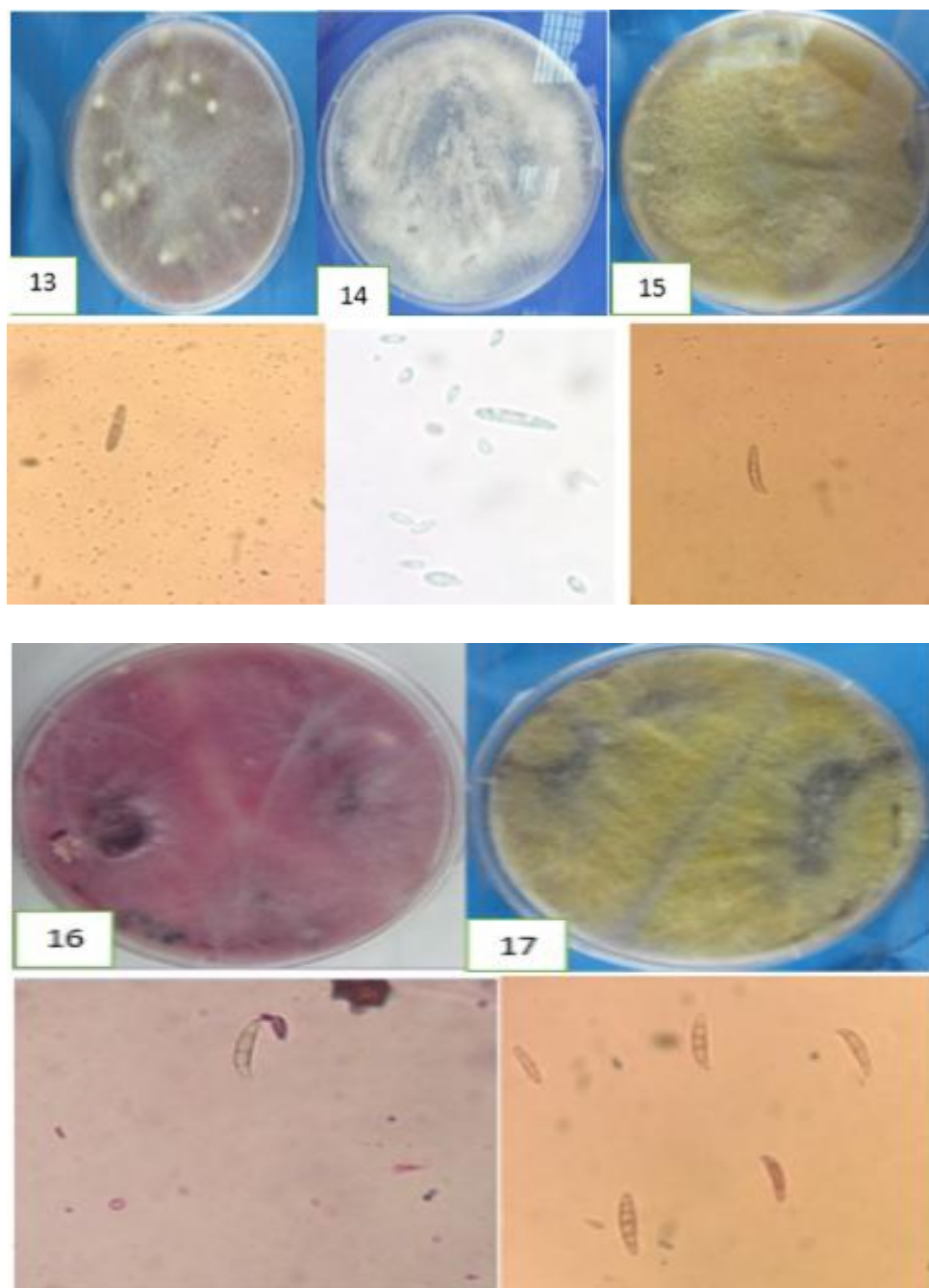


Figure 16 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de *Fusarium* obtenue.

Aspect morphologique et microscopique (G x 40) des colonies (13) (17) de *F.solani*

(14) colonie de *F.tricinctum* ;(15) colonie de *F.verticelloides* ;(16) colonie de *F.culmorum*

Isolat N°15, *Fusarium verticillioides*

Classe Adenomycetes

Ordre : Moniliales

Famille : Tuberculariacées

Genre : *Fusarium*

Initialement cultures ont mycélium blanc mais peuvent développer des pigments violets avec l'âge. Pigmentation dans l'agar varie, allant de pas de pigmentation ou orange grisâtre à gris violet, violet foncé ou magenta foncé (presque noire) dans d'autres.

Morphologie générale des macroconidies : Relativement long et mince, légèrement falciformes ou droite, et à paroi mince. Pour les Microconidies porte une forme Ovale à forme avec une base aplatie.

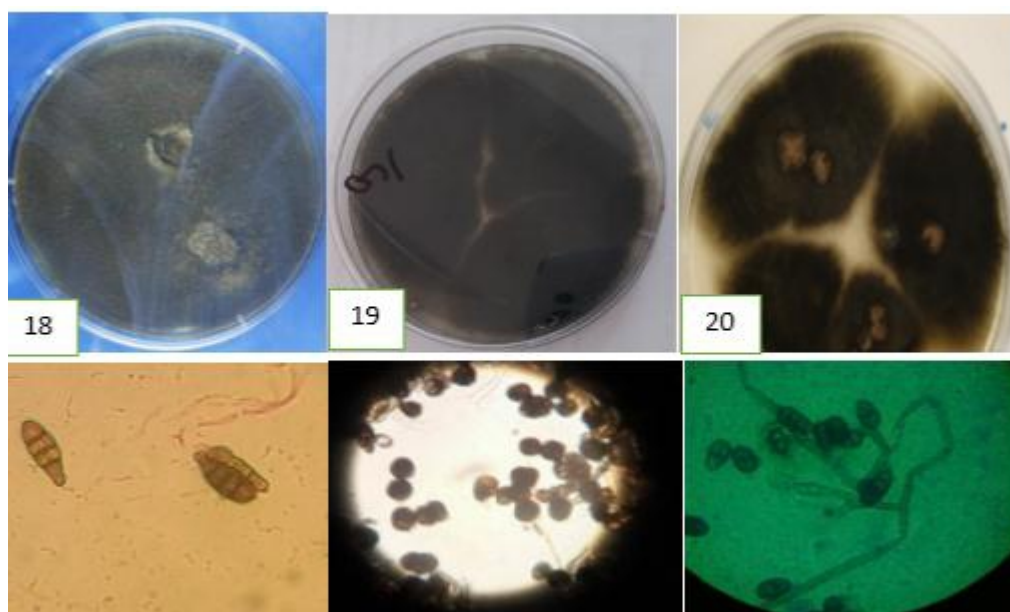


Figure 17: Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces d'*Alternaria* obtenue.

Aspect morphologique et microscopique des colonies d'*Alternaria* sp., (18) colonie de *A. tenuis* (19), (20) colonies d'*A. consortiale*

Isolat N°18, *Alternaria tenuis*

Classe : Adélomycètes (Champignons Imparfaites)

Ordre : Moniliales

Famille : Dématiacées

Genre : *Alternaria*

Le mycélium est blanc grisâtre. Les conidiophores produisent des chaînes d'une dizaine de spores, elles sont droites et très peu ramifiées. Les spores sont brunes, avec un bec court.

Isolat N°19, N°20, *Alternaria consortiale* :

Classification :

Adélomycètes (Champignons Imparfaites)

Ordre : Moniliales

Famille : Dématiacées

Genre : *Alternaria*

Caractères culturels : Les colonies mycéliennes sont vertes à marron foncé. Le mycélium aérien est ras et renferme une multitude de spores. Les conidiophores sont bruns, ils supportent un grand nombre de spores, produites le plus souvent isolées. Plusieurs types de spores sont présents dans la même culture :

- spores de type sphérique découpées par des cloisons en 2 ou 4 loges ;
- spores de type elliptique, ressemblant à des spores de certains *Stemphylium*. L'apex est rétréci et souvent arrondi aux deux extrémités
- spores de type *Alternaria* typique, munies d'un rétrécissement apical plus ou moins allongé.

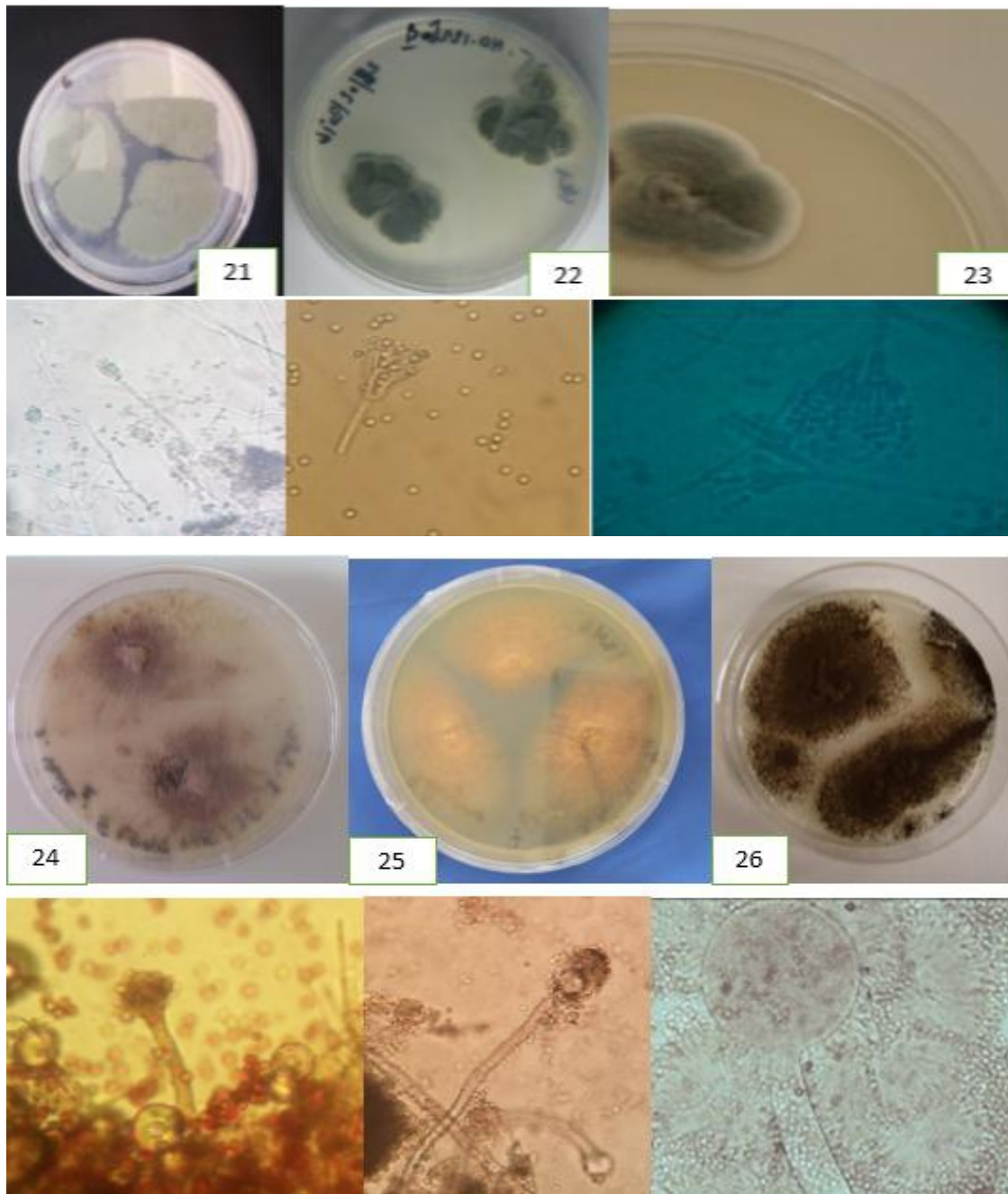


Figure 18 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de *penicillium* et *Aspergillus* obtenue.

Aspect morphologique et microscopique de ;(21), (22), (23) colonies de *Penicillium* sp (24) colonie *Aspergillus* sp. (25) colonie de *A.flavus* ;(26) *A.niger*.

Isolat N°21, N°22, N°23, *Penicillium sp*

Classe : Adélomycètes (Champignons Imparfaits)

Ordre : Moniliales

Famille : Moniliacées

Genre : *Penicillium*

Sur PDA, Les colonies mycéliennes sont vertes. Les conidiophores sont simples et divisés en plusieurs articles parallèles. A l'extrémité de chaque article, un ou plusieurs stérigmates donnent naissance à une multitude de spores. Les spores sont très nombreuses ; elles sont sphériques et lisses.

Isolat N°24, *Aspergillus Flavus*

Classe : Adélomycètes (Champignons Imparfaits)

Ordre : Moniliales

Famille : Moniliacées

Genre : *Aspergillus*

Caractères culturels, Les colonies mycéliennes sont poudreuses. Leur teinte est verte. Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête ovoïde avec une rangée de stérigmate. C'est à partir des stérigmates que les spores sont formées. Les spores, très nombreuses dans les cultures, sont claires, globuleuses.

Isolat N°25, *Aspergillus sp*

Classe : Adélomycètes (Champignons Imparfaits)

Ordre : Moniliales

Famille : Moniliacées

Genre : *Aspergillus*

Caractères culturels : Les colonies mycéliennes sont poudreuses, peu développées. Leur teinte est rose. Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête ovoïde avec une rangée de stérigmate.

C'est à partir des stérigmates que les spores sont formées. Les spores, très nombreuses dans les cultures, sont claires, globuleuses.

Isolat N°26, *Aspergillus niger* :

Classe : Adéomycètes (Champignons Imparfais)

Ordre : Moniliales

Famille : Moniliacées

Genre : *Aspergillus*

Caractères culturels : Les colonies mycéliennes sont poudreuses. Leur teinte est noire. Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique avec une rangée de stérigmate.

C'est à partir des stérigmates que les spores sont formées. Les spores, très nombreuses dans les cultures, sont claires, globuleuses.



Figure 19 : Caractérisation macroscopique et microscopique des espèces de *Colletotrichum* et *Rhizopus*

Aspect morphologique et microscopique (27) colonie de *colletotrichum lindemuthianum* ;(28) colonie de *Rhizopus*.

Isolat N°27, *colletotrichum lindemuthianum*

Classe : Adélomycètes (Champignons Imparfaits)

Ordre : Mélanconiales

Famille : Mélanconiacées

Genre : *Collectotrichum*

Caractères sur PDA.les colonies sont peu élevés et atteignent 3 à 4 cm de diamètres.

Les cultures sont d'abord gris clair. Puis une teinte plus noirâtre en raison de la formation des grandes soies dans les acervules.

Les acervules produisent également des spores en très grand nombre, qui s'agglomèrent en masses.

Les spores sont hyalines. Non cloisonées.cylindriques et arrondies à leur extrémité. Elles mesurent 11-21x3-4 μ (champion, 1997).

Isolat N°27, *Rizopus* sp :

1. Classification : Phycomycètes

Ordre : Zygomycètes

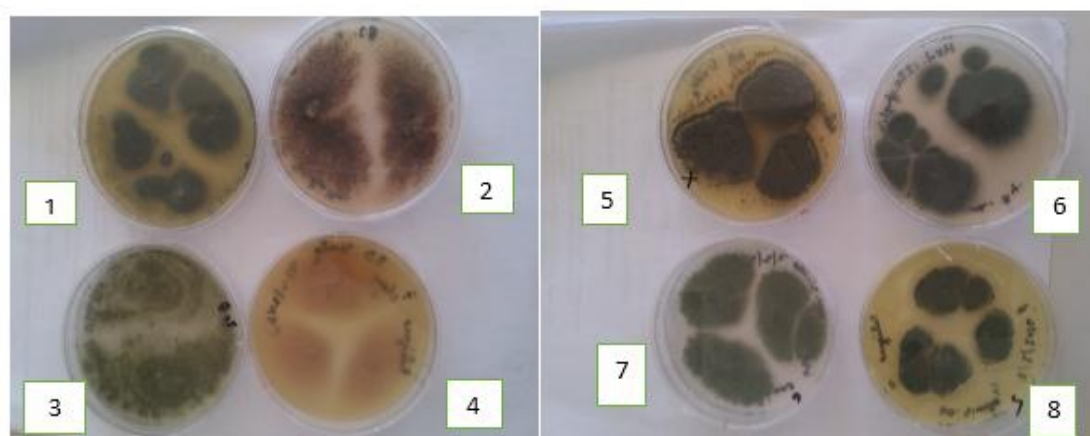
Genre : *Rizopus*

.Identification : Le mycélium forme des stolons sur lesquels apparaissent des rhizoïdes, sortes de petites racines qui permettent au champignon de se fixer sur le substrat, ou sur la boîte de pétri. A l'opposé se développent les conidiospores, au tour de la quelle se différencient les spores dans le sporange (sporocyste).

III. Identification toxigènes des espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* par CCM

Les extraits de filtrat de culture des 8 isolats d'*Aspergillus* et *penicillium* sélectionnés ont été soumis à une séparation par chromatographie sur couches mince dans le système de développement TEF (Toluène, Acétate d'éthyle et acide formique) l'interprétation a été réalisée sous la lampe UV (ultraviolet) de 360 nm.

Plusieurs spots ont été détectés sous UV, correspondant à des métabolites produits dans le milieu YES par les isolats étudiés.



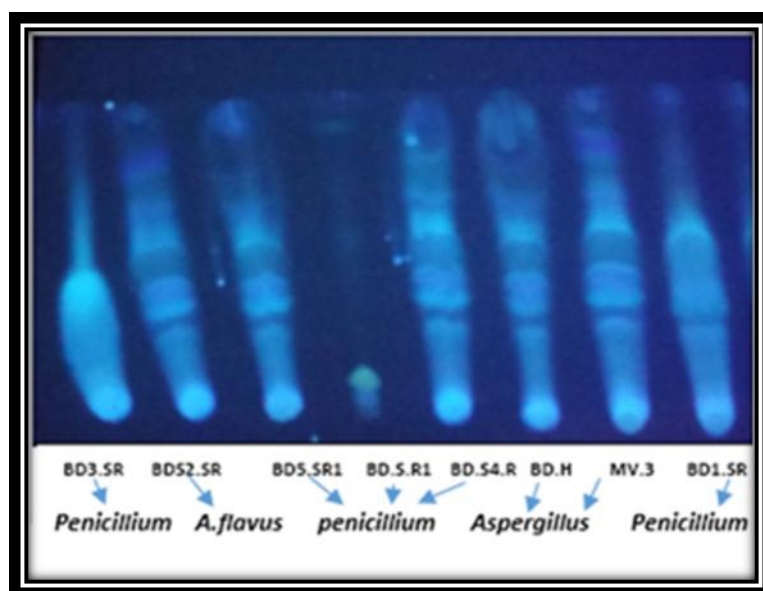
(Originale)

Figure 20 : les souches utilisant pour l'extraction liquide/liquide

Tableau 11 : liste des isolats utilisés pour la CCM.

N°d'isolat	Code	Especies
Iso 1	BD.S.R ₁	<i>Penicillium</i>
Iso 2	M.V ₃	<i>Aspergillus sp</i>
Iso 3	BD.H	<i>Aspergillus sp</i>
Iso 4	BD2.S.R	<i>A.flavus</i>
Iso 5	BD1.S.R	<i>Aspergillus</i>
Iso 6	BD ₃ .S.R	<i>Penicillium</i>
Iso 7	BD ₄ .H.R	<i>Penicillium</i>
Iso 8	BD ₅ .SR1	<i>Penicillium</i>

Les résultats montrent que les isolats 9 analysées d'*Aspergillus sp* et *Penicillium sp* ont le même distance de migration qui est : 7cm par rapport la longueur de la plaque 7cm. On observe que les souches ont le même profil sont fortement productrices d'aflatoxine. Sauf pour les deux isolats BD3.SR.et BDS.R1 ont faiblement marqué cette migration surtout pour le BDS.SR1 nous constatons pratiquement une absence de migration. (Figure22) Sur ce même pool d'échantillons, nous avons également quantifié sept espèces productrices d'Aflatoxines et ochratoxine à savoir :



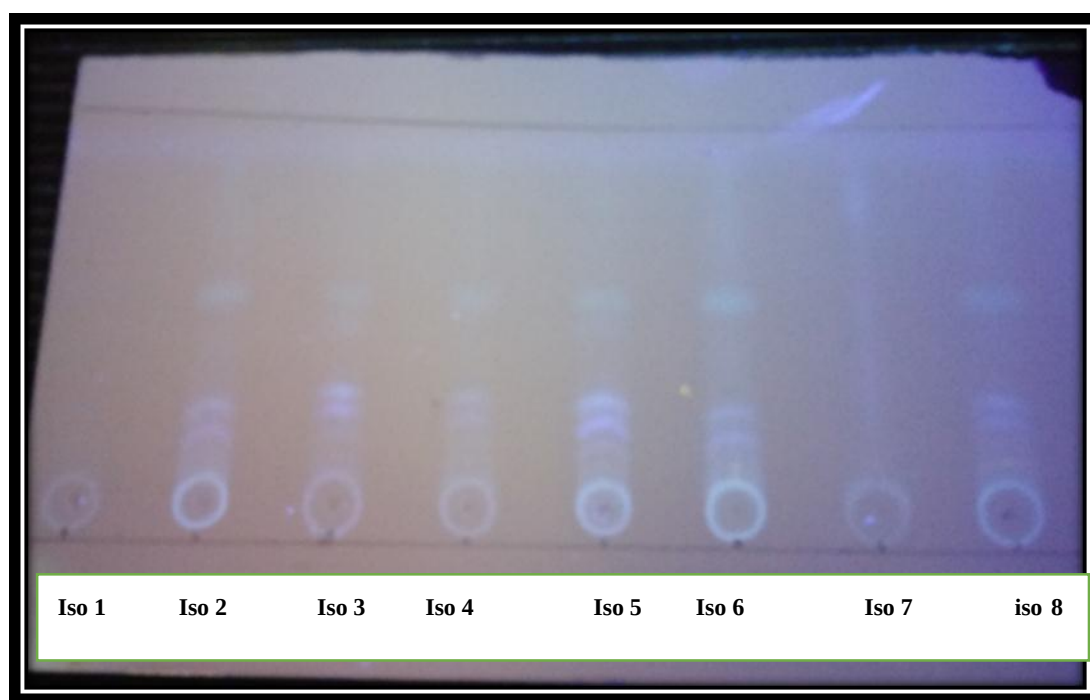
(Originale,2016)

Figure 21 : plaque CCM sous les rayons UV de 360nm.

Concernant les isolats de *Fusarium* la lecture sous UV à nécessite un révélateur chimique, chlorure d'Aluminium, On utilisant la lampe UV de 360 nm (figure 22)

Tableau 12 : Liste des Isolats utilisés pour le CCM.

N°Isolat	espèces
Iso 1	<i>F.culmorum</i> /NIV
Iso 2	<i>F.culmorum</i> /DON
Iso 3	<i>pseudograminearum</i>
Iso 4	<i>F.poa</i>
Iso 5	<i>F.culmorum</i>
Iso 6	<i>F.culmorum</i>
Iso 7	<i>F.graminearum</i>
Iso 8	<i>F.culmorum</i>



(Originale,2016)

Figure 22 : plaque CCM sous les rayons UV de 360nm.

La lecture de la plaque CCM sous la lampe UV permis de constater. Une belle séparation qui s'est produite sur la plaque des bondes linéaires. Avec de la même densité et qui émettent une florescence bleu. Pour la plupart des spots) cependant deux taches ont attiré notre attention florescence il s'agit de l'isolat 1 et isolat 2 ou il n'y a pas eu d'absorbance et de florescence marquées

par rapport aux autres isolats, mais nous avons remarqué qu'il existe comme même une légère migration pour l'isolat 7. Nous tenons à rappeler que les spots 1 et 2 correspondent à nos deux souches de référence *Fusarium culmorum* de chémotype Don/Adon et NIV respectivement. Il faut savoir que la toxine Niv est produite en très faible concentration par le champignon qui est difficile à détecter même par HPLC. Tandis que le DON est produit à de très forte quantité ce qui explique notre résultats et qui nous laisse dire ou identifier les deux *Fusarium* 1 et 7 de chémotype NIV et les autres isolats sont de chémotype DON.

III.1.Discussion

Les deux bandes linéaire qui apparaissent en premier représentent les formes acétylées du DON il s'agit du 3Adnet 15Adon pour *F.culmorum* et *F. graminearum*.

Les mycotoxines de *Fusarium* les plus fréquemment rencontrées lors de la fusariose du blé en Algérie et en Europe sont les trichothécènes de type B (Bottalico et Perrone, 2002 ; Touati-Hattab 2016). Les TCT B comprennent, entre autres, le déoxynivalenol (DON) et ses formes 15- et 3-acétylées (15- ADON et 3-ADON), le nivalenol (NIV) et sa forme acétylée la fusarenone X (FX).

Cette étude a révélé que le *F.culmorum* est l'espèce toxigène prédominante pour la production des trichotécènes.

L'effet de chémotype a bien apparu dans ce teste. Car les deux isolats de *F.culmorum* 1 et 2 ne montrent pas le même profil sur la plaque CCM. Par contre les isolats de *F.poa* et *F.pseudograminearum* sont deux espèces différentes mais présentent un profil identique dans leur migration.

L'examen des chromatoplaques pour les aflatoxines des extraits de filtrats de culture sur milieu YES que presque tous les isolats d'*Aspergillus sp* et *Penicillium sp*, ont secrété de l'aflatoxine et de l'ochratoxine.

Selon (Wicklow et al, 1980) et Pitt et (Hocking, 2006) l'*Aspergillus flavus* produit moins d'aflatoxine.

Selon (Duris, 2002) les conditions de conservations mal contrôlées posent un risque majeur pour la formation des mycotoxines (Duris et Hanak et al, 2002) rapportent que la durée destockage à une grande influence sur le développement de la flore fongique et la contamination en mycotoxines.

Les céréales sont, sans doute, les matières premières les plus exposées à la contamination fongique. Le développement fongique sur ces substrats peut avoir plusieurs conséquences tels que l'altération des propriétés organoleptiques, diminution des qualités nutritives, apparition des maladies ou accumulation de composés toxiques (mycotoxines).

Dans ce travail nous avons évalué le taux de contamination pour chaque variété des grains de blé et maïs qui viennent de plusieurs régions agricoles de l'Algérie porteuses de toute une gamme de champignons appartenant à des genres et espèces très variés. Nous avons classés en deux catégories : mycoflore interne et mycoflore externe.

La connaissance des espèces de *Fusarium* majoritaires sur céréales permet de mieux appréhender le risque sanitaire que constitue la production de mycotoxines par ces champignons et de mettre en place des moyens de lutte adaptés en prenant en compte des facteurs tels que le climat.

Les résultats de l'analyse sanitaire des variétés de blé et maïs analysées ont révélé la présence au niveau externe d'une mycoflore diversifiée où plusieurs genres ont été identifiés : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* et *Colletotrichum*.

Les résultats ont montré que 90% des grains analysés collectés des différentes régions, ont été infestés par les espèces des genres *Microdochium nivale*, *Fusarium culmorum* et l'identification morphologique a montré la présence des espèces fongiques à savoir *M. nivale*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium pseudograminearum* et *Fusarium avenaceum* (L'analyse de ces résultats a montré aussi que *Microdochium nivale* et l'espèce *Fusarium culmorum* étaient les espèces les plus dominantes représentant 40% des espèces isolées.

La dominance de chaque espèce dans une région donnée par les conditions climatiques. En effet, plusieurs travaux ont rapporté que l'espèce *Fusarium culmorum* est la plus dominante dans les pays de l'Afrique du Nord.

La deuxième partie de ce travail a porté sur la caractérisation du potentiel toxigène d'une collection de *Fusarium* et *Aspergillus* par Chromatographie sur couche mince (CCM) qui nous a permis de montrer la présence de deux types de toxines TCT B (DON, NIV) et Aflatoxine B₁ dans les grains.

En perspectives, il est intéressant de pousser les études pour une connaissance globale des différentes espèces responsables de la contamination des grains en Algérie.

Il est nécessaire d'effectuer un échantillonnage plus large dans les principales régions céréalière du pays et dans les différents étages bioclimatiques, afin d'identifier les espèces existants, leur pouvoir pathogène et leur fréquence selon les régions

La disponibilité d'une classification de la sensibilité des cultivars d blé et maïs est un outil de plus pour les agriculteurs comme moyen de lutte ces contaminants surtout les *Fusrium*. Toutefois, cette maladie étant très complexe, il ne faut négliger aucun des autres facteurs afin de réduire les risques de contamination des récoltes par les toxines.

ET mettre en place un système de contrôle et de surveillance de la contamination de blé et maïs par ces mycotoxines et aussi Crée des nouvelles stratégies de décontamination pour la lutte contre les mycotoxines.

1. **Abeledo L. G., Savin R., Gustavo A. et Slafer.** 2008. Wheat productivity in the Mediterranean Ebro Valley : Analyzing the gap between attainable and potential yield with simulation model. European journal of Agronomy. 28. 541-550p.
2. **AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).** 2006. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique. <http://www.afssa.fr>.
3. **Agrawal, V.K., et Sinclair, J.B.** 1996 .Principales of pathology.CRC Press in.Boca Roton, Fl., p.539.
4. **Aoki, T. et O'Donnell K.**1999.Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov. formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum* .Mycologia, 91, 597–609.
5. **ARC.** 1993. Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum, 56, 397-444.
6. **Asiedu, JJ.** 1999. La transformation des produits agricoles en zone tropicale.24 éd.Paris. boulevard Arago.302 p.
7. **Bajji M., Lutts S. et Kinet J. M.** 2001. Water déficit affects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. Plant Science. 160 : 669 -681p.
8. **Balzer, A., Tardieu, D., Bailly, J.D., et Guerre, J.** 2004. Les trichothécènes : nature des toxines présence dans les aliments et moyens de lutte. *Revue Méd. Vét.*155, 6, 299-314.
9. **Benmansour, B., Gormat, N.** 2005. Etude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de Magister, Algérie, Département de Biologie - Faculté des Sciences, Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbes -. 106 p.
10. **Bennett, J.W., et Klich, M.** 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Review 16: 497 516.
11. **BENSMIRA, S.** 2006. « Isolement et caractérisation de souches de milieux extrêmes (SoL Sobkha de la région de Beskra) productrice de cellulase thermostable à intérêt industriel ».
12. **Bottalico A.** 1998. Fusarium disease of cereals : species complex and related mycotoxin profiles in Euorpe.Journal of Plant Pathology 80 : 85-103.
13. **Botton, B.,Bretton,A.,Fevre,M.,Guy,Ph.,Larpent,JP.,Veau,P.,**1985. « Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle ». 2eme édition, Paris, Masson. 512 p.
14. **Botton.B, Breton.A, Fevre.M, Gauthier.S, Guy.Ph, Larpent J.P, Reymond.P, Sanglier J.J, Vayssier.Y, Veau.P.** 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, 2ème edition, MASSON.ISBN :2-225-81987-4.

15. **Boufenar., Zeghouane, F., Zaghoulane, O.**2006. « Guide des principales variétés de céréales à paille en Algérie (blé dur, blé tendre, orge et avoine) », ITGC ICARDA.1ère édition ITGC. Algérie, 154 p.
16. **Broggi,L.E.,Resnick,S.L.,Pacin,A.M.,Gonzalez,H.H.,Cano,G.,Taglieri,D.**2002.Distribution of fumonisins in dry-milled corn fraction in Argentina.Food Addit.Cantam.19 :465-469.
17. **Cappeli, C.**1997.Pathologie des semences.cours "production des semences"Perugia Italia Florence, 3-4.
18. **Chagnier, B., Richard-Molard.**1989, moisissures des aliments peu hydratés, collection sciences et techniques agroalimentaires, 171-175.
19. **Champion, R.**1997.Identifier les champignons transmis par le semences.Ed :INRA.Paris.398p.
20. **D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C.**1997. Mycotoxins. Animal Feed ScienceTechnology, 69, 155-166.
21. **Davet, P. et F. Rouxel.** 1997. « Détection et isolement des champignons du sol ». INRA édition. Paris. 201 p.
22. **Davis N. D., U. L. Diener., D. W. Eldridge.**1966. Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, Applied Microbiology, American Society for Microbiology, Vol. 14, No. 3.
23. Diplôme de Magister. Constantine. Université de Mentouri. 166 p.
24. **Dunkel, F.V.** 1988. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. Int. Food Microbiol. 7: 227-244.
25. **Duran, J.A., Malvar., A., Pereiro, M., Pereiro, Jr.M.**1989. Fusarium moniliforme keratitis, Acta ophthalmol. Scand 67 : 710-713.
26. **FAO Eurostat.** 2013. agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/PDF/Gaf13p121-126.pdf.
27. **FAO.**2013. Les Fumonisine dans le maïs et les produits à base de maïs.11 p.
28. **FAO.**2013. limites maximales pour le déoxynivalénol (DON) dans les céréales et les produits à base de céréales et des plans d'échantillonnage correspondants.6p.
29. **FAO.**2015.Bulletin sur l'offre et la demande de céréales 2015, céréales2012.<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>.
30. **Feillet, P.** 2000. Le grain de blé composition et utilisation. Ed. INRA, Paris, 308 p.
31. **Fourar, R. Lessard, F.** 2015. Évaluation expérimentale de la sensibilité aux attaques du charançon du riz de variétés d'espèces céréalières cultivées en Algérie, 24, n. 5,291p.
32. **Garcia, S., Herdia, N.**2006.**Mycotoxins** in Mexico : Epidemiology, management and control strategies.Mycopathologia 162 (3) :255-264.

33. **Garcia, S.,** Herdia, N.2006.Mycotoxins in Mexico : Epidimiology, managment and control stratégies.Mycophatologia 162(3) :255-264.
34. **Gilchrist, L. and Dubin, H.J.** 2002. Fusarium head blight. In:Curtis, B.C., Rajaram, S., Gomez Macpherson, H. (eds.), FAO Plant Production and Protection Series No. 30, Bread Wheat Improvement and Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0j.htm#bm19>.
35. **Hallauer, AR., Miranda, JB.**1981. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, Ames, USA.
36. **Hamed K. Abbas, R.M., Zablotowicz, M.A., Weaver, B.W. Horn, W., et W.T. Shier.**2004. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta Aspergillus isolates. Can. J. Microbiol. 50: 193–199.
37. **Hell, K., Cadwell.K.F., Setamou, M., Schulthess, F.**2000.Influence of insect infest tion on aflatoxin cintamination of stored maize in four agroecological region of Benin.African Entomologie 8 :169-177.
38. **Henry Y., De Buyser J.** 2000. L'origine des blés. Pour la Science, Hors-série n.26, p 60-62.
39. **IARC.** 1983 .Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum, 31, 153-161.
40. **Jaritz, G., et Bonnejmte, M.** 1997. Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc.Rebat : 244-253.
41. **Jeunot, B.**2005. « Les fusaritoxines sur céréales : détection, risques et nouvelle réglementation ». Thèse de doctorat. Nancy. Université Henri Poincaré. 111 p.
42. **Jiménez M., Mateo JJ., Mateo R.**2000. Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride dramatization and fluorescence detection, J. Chromatogr. A, 870, 473–481
43. **Jouany, Yiannikouris, A.** 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Productions Animales, février 2002, 15 (1), p.3-16.
44. **Kristensen, C.M. ; Meronuk, R.A., et Sauer D.B.** 1982. Microflora.. Chapitre 9. In : Storage of cereal grains and their products (Christensen C. M. Ed), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, p. 219-240.
45. **Krska, R, Josephs R.** 2001. The state of the art in the analysis of oestrogenic mycotoxins in cereals. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 369 : 469-76.
46. **Larpent, J.P.and Larpent-gourgaud, M.** 1997.Mémento technique de microbiologie 3^{ème}édition Tec et doc Lavoisier Paris.946 p.
47. **Le Bars, J., et P. Le Bars.** 1982. Facteurs de l'accumulation d'acide pénicillique dans les denrées d'origine végétale. Science des Aliments, 29-33 p

48. **Le Bars, J. et Le Bars, P. 1988.** Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquence. *Bull. Asso, Doc lavoisier*, Paris, 946 p.
49. **Leslie, J.F. et Summerel, A. 2006.** “The Fusarium laboratory manuel”. 1ère ed. Blackwell Publishing. Ioa. 369 p.
50. **Lin L, Zhang J, Wang P, Wang Y, Chen J. 1998.** TLC of mycotoxins and comparison with others chromatographic methods, *J. Chromatogr. A*, 815, 3–20
51. **Luchese, R.H. and Harrigan W.F. 1993.** Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.* 74 : 5-14.
52. **Luo, M., Dang, P., Guo, B.Z., He, Holbrook, C.C., Bausher, M.G., Lee, R.D. 2005.** Generation of expressed sequence Tags (ESTs) For gene discovery and marker development in cultivated peanut. *Crop science* 45 :346-353.
53. **Lutz, M.P., Feichtinger, G., Défago, G et Duffy, B. 2003 .** Mycotoxigenic *Fusarium* and Déoxynivalenol Production Repress Chitinase Gene Expression in the Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* P1 Appel *Environ. Microbiol.* 69(6) :30777-3084.
54. **McMullen, M., Enz, P.J., Lukach, J., and Stover, R. 1997.** Environnemental conditions associated with Fusarium head blight epidemics of wheat and barley in the northern Great Plains, USA. In : Dill-Macky, R. and Jones, R.K. eds. 1997. National Fusarium head blight forum, Sheraton Inn Midway, November 10-12, St. Paul, MN. 46–47 p.
55. **Micco, C., Grossi, M., Miragli, M. and Brera, C. 1989.** study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Addit. Contam.* 6: 333–339.
56. **Molinié, A., Pfohl-Leszkowicz, A. 2003.** Les mycotoxines dans les céréales les points Importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire- Auzeville - Tolosane. Note de 1 'ASEDISSO N° spécial Mycotoxines (2003), 9 p.
57. **Mosiniak M., Prat R. et Roland J.C. 2006.** Du blé au pain, U.F.R. Biologie, U. P. M. C. pages 1-10.
58. **Nakazato, O.M., Marozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T., Kasai, N. 1990.** Interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxin by several fungi. *Appl. Environ. Microb.* 56(5) :1465-1470.
59. **Neergaard, P. 1981.** Risks for EPPO region from seed-borne pathogens. *EPPO Bulletin* 11 :207-212.
60. **Nelson, P.E., Toussoun, T.A., et Marasas W.F.O. 1983.** *Fusarium species : an illustrâtes manual for identification.* Pennsylvania state Univ. Editor.
61. **Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E. 2006.** Isolation of bacterial antagonists *Aspergillus Flavus* from almonds. *Microb. Ecol.* 52 (1) :45-52.

62. Parry D. W., Jenkinson P. et McLeod L., 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathology* 44, 207-238.
63. **Parry, DW, Jenkinso, P, McLeod L.** 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals a review. *Plant Pathology* 44, 207–238.
64. **PCS.** 1990. Selected Mycotoxins : Ochratoxins, trichothecenes, ergot. *Environmental Health Criteria* 105, W.H.O., Geneve, 263.
65. **Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M.** 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organisation.* 77: 754-766.
66. **Pfohl-Leszkowicz A., Chekir-Ghedira L. et Bacha H.** 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxine : DNA adducts formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis.* 16 : 2315-2320.
67. **PfohlLeszkowicz, A., et Castegnaro, M.** 2002. Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancers. Dans *Toxines et recherches biomédicales*, collection SFET, Goudey–Perrière, F., Bon Cassian, Puiseux-Dao, S. & Sauviat M–P (eds) Elsevier, 143–152 p
68. **Pfohl-Leszkowicz, A.** 1999. Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. *Technique et Documentation*, Paris, 18- 35 p.
69. **Pitt J.I.** 1988. *Laboratory guide to common Penicillium species*, Academia Press editor, London.
70. **Pitt John I. et Hocking Ailsa D.** 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Third edition, Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
71. **Pommela, B., Gallais, A., Coqueb, M., Quiller I., Hirel, B., Prioul, JL., Andrieu., B, Floriot M.** 2006. Carbon and nitrogen allocation and grain filling in three maize hybrids differing In leaf senescence. *Europ. Journal. Agronomie* 24: 203–211.
72. **Raper, K. et Fennell, D.J.** 1965. *The genus Aspergillus*, Williams and Wilkins editors Baltimore.
73. **Roudaut, H., Lefranq.E.** 2005. *Alimentation théorique*, Série science des aliments, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitane. 305 p.
74. **Soltner, D.** 2005. *Les grandes productions végétales*. 20eme Edition. Collection sciences et Techniques agricoles. Bressuire, France, 472 p.
75. **Sramkováa, Z., Gregováb, E., Sturdík, E.** 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain, n. 2, p 115 – 138.

76. **Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J. and Schlatter, C.** 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxicol.* 33: 341–355.
77. **Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y.**2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 882 : 23-8.
78. **Touati-Hattab., S.** 2016. Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*. DOI 10.1007/s10658-016-0869-y.
79. **Trenholm H.L., Prelusky D.B., Young J.C. and Miller J.D.** 1988. Reducing Mycotoxins in Animal Feeds, *Agriculture Canada* a 63 : 1827-1988.
80. **Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. and Sakabe, Y.** 1985. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. *Mycopathologia* 90: 181–186.
81. **Xu ,XM., Parry, DW., Nicholson, P., Thomsett, MA., Simpson ,D., Edwards ,SG., Cooke ,BM., Doohan, FM., Brennan, JM., Moretti, A., Tocco G., Mule G., Hornok, L., Giczey, G., Tatnell, J.** 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* 112, 143-154.
82. **Zheng M, Richard JL, Binder J.**2006.Methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161 : 261-73.
83. **Zinedine, A., Idrissi, L.**2007. Présence et réglementation des mycotoxines dans les aliments au Maroc : Situation actuelle et perspectives. Rabat, Maroc, Décembre 2007, n 7, p13-18.

Composition de milieux de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

- Agar-agar 20 g
- Pomme de terre 200 g
- Dextrose (Glucose) 20 g
- Eau distillée 1000 ml

Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar (DCPA) pour un litre de milieu

- Peptone bactériologique 15 g
- K_2HPO_4 1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g
- Chloramphénicol 0.2g
- Crystal Violet en solution aqueuse 1ml
- Agar 15g
- Eau distillée 1000ml
- 0.2g de dichloron dans 100ml d'éthanol
- 50mg de Crystal violet dans 100ml d'eau distillée.

Composition de milieu CMC (Carboxy-Méthyl-Cellulose)

- Carboxyle-méthyl-cellulase 15 g/l
- Extrait de levure 1g/l
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l
- NH_4NO_3 1 g/l
- KH_2PO_4 1g/l
- Eau distillée 1000 ml

Composition de Milieu MS (MycotoxinSynthetic medium)

- KH_2PO_4 0.6g/L
- K_2HPO_4 0.017g/L
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L
- Biotine 0.1mg/L
- Glucose 20g/L
- Solution de sels minéraux 50X 0.1ml/L
- Eau distillée 1000ml

Remarque : La préparation de ce milieu de culture consistait dans un premier temps à faire dissoudre le glucose dans l'eau puis à l'autoclaver 30 min à 105°C. puis les différentes solutions des autres constituants ont été additionnées stérilement.

Le milieu YES : Yeast Extract Sucrose :

- Extrait de levure 20 g
- Saccharose 40 g
- Eau distillée 1000 ml