

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: **BENBOUDINA Djamila**

DOMAINE: SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE: SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION: Protection des végétaux et de l'environnement

Thème

Contribution à l'étude des acides phénoliques chez le blé et leur effet inhibiteur sur la biosynthèse des trichothécènes B.

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mr : OUBRAHAM FARID	MAA	Président
Mlle: ZAZA MESSAOUDA	MAB	Examinatrice
Mme: TOUATI HATTAB SIHEM	MAA	Promotrice
Mr : BENINAL LYES	Inspecteur Principal au CNCC	Co-Promoteur

Promotion : Juin – 2017



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة عمار ثليجي - الأغواط

كلية: العلوم

قسم: العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالب (ة): بن بوذينة جميلة

ميدان: علوم الطبيعة والحياة

شعبة: علوم فلاحية

تخصص: حماية النبات والبيئة

العنوان

مساهمة لدراسة الأحماض الفينولية في القمح وتأثيرها بشكل خاص على الانتاج الحيوي
للـ *trichothecenes B.*

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم واللقب	الدرجة العلمية	الصفة
فريد أوبراهام	أستاذ محاضر - أ-	رئيسا
مسعودة زازة	أستاذ محاضر - ب-	ممتحنا
سهام تواتي حطاب	أستاذ محاضر - أ-	مشرفا ومقررا
إلياس بنينال	مفتش رئيسي ب: CNCC	مساعد مشرف

دفعة: جوان 2017

Résumé

*La fusariose est parmi les maladies les plus importantes, qui attaquent le blé. Elle est associée à plusieurs espèces de genre *Fusarium* et *Michrodochium nivale*.*

*L'objectif de ce travail est l'identification des espèces de *Fusarium* isolées à partir de grains de blé et évaluation de la sensibilité de six variétés de blé dur (*Triticum durum*) et trois variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*), à la fusariose, ainsi qu'une caractérisation biochimique de ces variétés de blé. L'effet des acides férulique et caféique sur la biosynthèse des TCTB a été aussi étudié.*

*L'identification morphologique et l'analyse par PCR ont permis d'identifier le *F.culmorum*.*

Dans cette étude La composition des extraits naturels d'acides phénoliques isolés des épi des neuf variétés de blé ont été analysés par CCM. Les acides férulique, caféique ont été identifiés l'acide férulique étant largement majoritaire.

*Ce travail entreprend l'inhibition de la production des mycotoxines de *Fusarium* par les acides phénoliques. des cultures liquides et solide sur riz de *F. culmorum* sont supplémentées par des extraits des acides férulique et caféique, la production de trichothécènes B est totalement inhibée*

Mots clés : Blé, composés phénolique, *Fusarium*, TCTB

بن بوذينة جميلة

الملخص:

الفيوزاريوز *fusariose* من أهم الأمراض التي تصيب القمح. وهو مرتبط مع عدة أنواع من جنس الفيوزاريوم

Fusarium والميكروودوشيوم نيفال *Michrodochium nivale*

والهدف من هذا العمل هو تحديد أنواع الفيوزاريوم المعزولة من حبوب القمح وتقييم حساسية ستة أصناف من القمح القاسي وثلاثة أصناف من القمح اللين, ووصف الكيمياء الحيوية لهذه المجموعة المتنوعة من القمح. كذلك تمت دراسة تأثير حمض الفيرليك والكافيك على TCTB الحيوي.

بواسطة التحديد الصرفي وتحليل PCR تعرفنا على *F.culmorum*.

في هذه الدراسة تم تحليل تكوين مستخلصات طبيعية من الأحماض الفينولية المعزولة من أصناف القمح بواسطة CCM. تم تحديد حمض الفيرليك بنسبة كبيرة، الكافيك.

وقد بدأ هذا العمل تثبيط إنتاج الفيوزاريوم السموم الفطرية كليا بواسطة الأحماض الفينولية.

الكلمات الدالة: القمح، المركبات الفينولية، الفيوزاريوم، TCTB.

Abstract :

Fusarium wilt is among the most important diseases that attack wheat. It is associated with several species of genus *Fusarium* and *Microdochium nivale*.

The objective of this work is to identify *Fusarium* species isolated from wheat grains and to assess the sensitivity of six varieties of durum wheat (*Triticum durum*) and three varieties of common wheat (*Triticum aestivum*), *Fusarium* wilt, As well as a biochemical characterization of these wheat varieties. The effect of ferulic and caffeic acids on TCTB biosynthesis has also been studied.

Morphological identification and PCR analysis allowed the identification of *F.culmorum*.

In this study, the composition of the natural extracts of phenolic acids isolated from the ears of the nine varieties of wheat was analyzed by CCM. Ferulic, caffeic acids have been identified with ferulic acid being predominantly in the majority.

This work begins the inhibition of the production of *Fusarium* mycotoxins by phenolic acids. Liquid and solid cultures on *F. culmorum* rice are supplemented with extracts of ferulic and caffeic acids, production of trichothecenes B is totally inhibited

Key words: Wheat, phenolic compounds, *Fusarium*, TCTB



Dédicace

*Je dédie ce travail 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 mes frères & A mes sœurs

A tous mes collègues et mes amis





Remerciement

Avant d'exposer le contenu de ce travail, nous remercions « Dieu », le tout puissant de nous avoir donnée le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science et de la connaissance.

*Mes profonds remerciements vont à **Mme : TOUATI. Siham** à l'université de Laghouat pour nous avoir encadrée et dirigée, pour ses encouragements et son soutien tout au long de cette thèse, et surtout pour disponibilité qu'elle a fait preuve à notre égard et l'attention qu'elle nous consacrée malgré ses nombreuses obligations. Nous remercions aussi notre co-promoteur **Mr : BENINAL .Ilyes** à l'ENSA Alger. **Merci infiniment !***

*Nous remercions **Mr : OUBRAHAM. Farid** à l'université de Laghouat, que nous avons l'honneur de présider le jury de ce mémoire, pour ces conseils et ses encouragements. Nous voudrions aussi lui faire part de notre profonde reconnaissance pour les nombreuses discussions autour de la problématique de notre thèse et le partage de ses connaissances qui sont très bénéfiques.*

*Nous remercions au **Mlle : ZAZA Messaouda** à l'université de Laghouat, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche et pour l'acceptation d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions.*

*Toute notre gratitude va également aux, le directeur de CNCC et toutes leur équipes, les ingénieurs de laboratoire d'agronomie de Laghouat **Melle : Ranan** et **Mme : Halima**, en particulier les membres de l'équipes de la protection des végétaux et de l'environnement, a tous mes profs de la wilaya de Msila, ainsi qu'à tous mes collègues pour leur soutien et pour toutes les bons moments passées ensemble.*



Sommaire	
Résumé	
Dédicace	I
Remerciement	II
Sommaire	III
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	VIII
Introduction	01
Partie I : Données bibliographique	
1. Le blé	03
1.1. Généralités	03
1.2. Importance économique	03
1.2.1. Dans le monde	03
1.2.2. En Algérie	04
1.3. description botanique de la plante	04
1.4. Composition chimique des grains	05
1.5. Cycle de développement du blé	06
1.5.1. Période végétative	06
1.5.2. Période reproductrice	06
1.5.3. Période de maturité	06
1.6. Pathologie de la plante	07
2. La fusariose	07
2.1. Symptomatologie	08
2.2. Cycle de développement	09
3. Les mycotoxines	10
3.1. Les trichotécènes	11
3.1.1. Les propriétés physico-chimiques des trichothécènes	11
3.1.2. La toxicité	12

3.1.3. La Règlementation	13
3.2. Principales méthodes de détection et de quantification des mycotoxines	13
4. Composés phénoliques	13
4.1. Généralité sur les composées phénoliques	13
4.2. Les principales classes de composés phénoliques	14
4.3. Rôles, intérêts et propriétés des composés phénoliques	14
4.4. Les acides phénoliques et les mécanismes de résistance des grains de blé à la fusariose	15
Partie II : Matériel et Méthodes	
2. Matériel et méthodes	16
2.1. Matériel végétal	16
2.2. Matériel fongique	16
2.3. Isolement des <i>Fusarium</i> à partir de grains de blé	17
2.3.1. Méthodes d'isolement	17
2.3.2. Identification morphologiques	17
2.3.3. Identification macroscopique	17
2.3.4. Identification microscopiques	18
2.4. Evaluation de la sensibilité variétale vis-à-vis de <i>Fusarium culmorum</i>	18
2.4.1. Préparation de la suspension sporale	18
2.4.2. Inoculation	18
2.5. Extraction des acides phénoliques à partir des épis de neuf variétés de blé au stade floraison	19
2.5.1. Essai au champ pour la caractérisation biochimique des variétés de blé	19
2.5.2. Extraction des composés phénoliques liés	19
2.5.3. Analyse chromatographique sur couche mince	21
2.6. Effet modulateur des acides phénoliques sur la production des mycotoxines	21
2.6.1. Conditions de cultures sur milieu liquide et supplémentation en acide phénoliques	22
2.6.2. Conditions de cultures sur milieu solide et supplémentation en acide phénoliques	22

2.7. Effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne	24
2.8. Identification moléculaire des espèces fongiques	24
2.8.1. Extraction de l'ADN	24
2.8.2. Amplification spécifique par PCR	25
Partie III : Résultat et discussion	
3. Résultats et Discussion	26
3.1. Isolements et identification morphologique	26
3.2. l'identification moléculaire	28
3.3. l'évaluation de la sensibilité variétale	29
3.4. la Supplémentation des cultures par les acides phénoliques	30
3.4.1. Repiquage des souches dans le milieu PDA supplémenté par les acides phénoliques	30
3.4.2. Extraction des mycotoxines à partir de milieu MS supplémenté en les	31
3.4.3. Résultat d'extraction des mycotoxines à partir de milieu solide supplémenté en les acides phénoliques	34
3.5. Analyse des composés phénoliques des variétés de blé testés par CCM	34
3.6. Discussion générale	35
Conclusion	37
Références bibliographique	38
Annexes	43

Tableau	Page
Tableau 01 : Principaux constituants du grain du blé	06
Tableau 02 : Les principales classes de composés phénoliques	14
Tableau 03 : Présentation des échantillons du blé collectés	16
Tableau 04 : Liste des différents isolats Fusariens utilisés.	16
Tableau 05 : Echelle d'évaluation utilisée pour l'estimation l'infection Par <i>Fusarium</i> sur épi,	19
Tableau 06 : Taux de contamination de différentes semences analysées.	26
Tableau 07 : Diamètre des colonies de différents isolats de <i>F. culmorum</i>	31

Figure	Page
Figure 01 : la morphologie du plant de blé	04
Figure 02 : Schéma d'un grain de blé	06
Figure 03 : Shéma illustrant le cycle de développement du blé	07
Figure 04 : Spores de <i>F.culmorum</i>	08
Figure 05 : Des épis de blé fusariés	09
Figure 06 : Grains seins (A) et fusariés (B) du blé	09
Figure 07 : cycle biologique de <i>Fusarium</i> , principal agent responsable de la Fusariose des épis de blé	10
Figure 08 :Structure générale des trichothécènes	12
Figure 09 : poudre obtenue après le broyage de matériel végétal.	20
Figure 10 : Préparation de surnageant pour l'extraction.	20
Figure 11 : L'inoculation d'un milieu solide supplémenté en acides phénoliques.	23
Figure 12 : Evaporation des extraits	24
Figure 13 : Présentation des pourcentages d'infestations des semences des variétés analysées.	27
Figure 14 : Produits d'amplification spécifique de <i>F. culmorum</i> . M: marqueur de poids moléculaire 100 pb; Ligne 3-5-6: amplification chez 4 isolats de <i>F. culmorum</i> ; T: témoins positif ; H2O: témoin négatif.	28
Figure 15 : Indice d'attaque pour les différentes variétés	29
Figure 16 : Croissance mycélienne de l'isolat <i>F.culmorum</i> sur milieu PDA en présence de l'acide caféique, acide ferulique comparée à un témoin.	31
Figure 17 : Résultat de la migration des mycotoxines à partir de milieu MS sans UV	32
Figure 18 : Résultat de la migration des mycotoxines de milieu MS sous UV 366 nm	33
Figure 19 : CCM 254 nm de la phase aqueuse de mycotoxine de milieu solide	34
Figure 20 : CCM sous UV 254 nm de la phase aqueuse de neuf variétés de blé tendre et de blé dur au stade floraison dans le système (50/20/25 : H ₂ O distillé/n-butanol/EtOH).	35

3-ADON :	3-acétyl-déoxynivalénol
ACN :	Acétonitrile
15-DON :	15- acétyl-déoxynivalénol
DON :	Le déoxynivalénol
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
NIV :	Nivalénol
PDA :	Potato Dextrose Agar
ppm :	Parties par million
rpm :	Rotation par minute
TCT :	Trichothécène
TCT B :	Trichothécène de type B
DCPA :	Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar
MS :	Mycotoxin Synthetic medium
CCM :	Chromatographie sur couche mince
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
µg :	Microgramme
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
Rpm :	Rotation par minute
F :	Fusarium
FAO :	Food and Agriculture Organization
nm :	Nano mètre
UV :	Ultra violet
CNCC :	Centre National de Contrôle et Certifications des Semences et des Plants Alger
INRA :	Institut National de recherche Agronomique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le blé constitue une céréale d'importance primordiale à travers le monde, d'un point de vue économique et en tant que denrées alimentaires pour l'homme. En Algérie, les produits Céréaliers, dont le blé, occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (Djermoun, 2009). Il existe plusieurs facteurs influençant sur le blé. Des facteurs abiotiques ou climatiques et des facteurs biotiques ou micro-organismes.

Les champignons pathogènes du genre *Fusarium* sont responsables de contaminations majeures des blés induisant la fusariose (champion, 1997).

La fusariose de l'épi est connue comme l'une des maladies les plus redoutables du blé dans les Régions céréalières humides et sub humides de par le monde (McMullen^{etal}, 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 atteints. 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.

Plusieurs facteurs peuvent influencer les niveaux de contamination des grains en fusariotoxines, tels que les facteurs climatiques, les pratiques culturales, la présence d'inoculum et sa dispersion et le facteur variétal (Boutigny, 2007).

Dans des travaux il a été rapporté qu'une sensibilité différente à l'accumulation de mycotoxines au sein des variétés de blé dur disponibles est connue. les plantes pourraient réduire l'accumulation des mycotoxines en inhibant leur biosynthèse sous l'action de composés endogènes des grains. Ces composés pourraient être constitutifs des grains ou induits en réponse à l'infection par le pathogène. Actuellement, différents composés avec des propriétés antioxydantes, comme les composés phénoliques, des peptides ou les caroténoïdes ont été décrits comme des composés "modulateurs" de la biosynthèse des mycotoxines. (boutigny, 2007).

Dans ce contexte, le but de notre travail est de rechercher des acides phénoliques au niveau des neuf variétés testées en plein champ vis-à-vis de fusariose de l'épis. Ces acides phénoliques comme composé de la plante pouvant avoir un effet potentiel sur

l'accumulation de toxines dans les grains fusariés. L'identification de tels composés pourrait permettre de sélectionner des variétés pour leur composition plus ou moins riches en composés modulateurs de la mycotoxinogénèse.

Afin d'identifier et caractériser ces composés phénoliques deux méthodes ont été menées. La première consiste à l'extraction des acides phénoliques liés à partir de l'épi au stade floraison et la deuxième stratégie menée consiste en l'étude *in vitro* de ces molécules pour leur pouvoir modulateur vis-à-vis de la biosynthèse des toxines par *Fusarium*.

Partie I : Données bibliographique

1. Le blé :

1.1. Généralités :

Trois céréales blé, riz et maïs constituent la base alimentaire des populations du globe. Durant le développement de la civilisation indo-européenne, le blé est devenu la principale céréale des peuples occidentaux sous climat tempéré (Henry et De Buyser, 2000). Le blé est une plante annuelle herbacée, monocotylédone qui appartient au genre *triticum* de la famille des graminées. Dont les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*).

La totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréalières (Bonjean et Picard, 1990).

L'existence de variétés adaptées à différents milieux et résistantes à des nombreuses maladies permet de cultiver le blé sous différents étages bioclimatiques. Il existe des blés d'hiver et des blés de printemps, leurs dates de plantation et de récolte sont différentes. Plus de vingt mille variétés de blé existent et des nouvelles sont créées chaque année (Feillet, 2000).

Le blé tendre est apparu entre 5000 et 6000 ans avant Jésus-Christ dans le croissant fertile puis s'est dispersé à partir de la Grèce en Europe (Doussinault *et al.*, 1992). C'est à partir de cette zone que les blés ont été diffusés vers l'Afrique, l'Asie et l'Europe. La route la plus ancienne de diffusion des céréales vers les pays du Maghreb fut à partir de la péninsule italienne et de la Sicile (Boulal *et al.*, 2007). Il est destiné à l'industrie de la meunerie et permet d'obtenir une farine de bonne qualité, dotée d'une aptitude pour la panification et contenant environ 8 à 10 % de gluten (Fredot, 2012).

Le blé dur est de forme effilée, une teneur protéique importante dans la santé ainsi qu'un albumen de consistance cornée plus difficile à réduire en farine. Ce dernier est aussi plus riche en gluten, en lipide, minéraux et en vitamines (Fredot, 2012).

1.2. Importance économique :

1.2.1. Dans le monde :

Historiquement, le blé est l'une des trois céréales les plus cultivées dans le monde, D'un point de vue quantitatif (Shewry *et al.*, 2009). Les deux principales espèces actuellement cultivées sont le blé tendre et le blé dur. La Chine, l'Australie, le Canada, l'Argentine, l'Inde, Russie, Allemagne, Pakistan et les États-Unis ont toujours été actifs dans la production et le commerce des grains assurant environ le tiers des exportations

mondiales de blé de la planète, La France quand à elle se situe au second rang mondiale des exportations du blé dur, En Méditerranée, le blé occupe une place essentielle dans les sociétés et ses modes de consommation, (Abis, 2012). Selon Rastoin & Benabderrazik (2014), la production de blé se répartit entre blé dur (70 % en 2012) et blé tendre (30%),

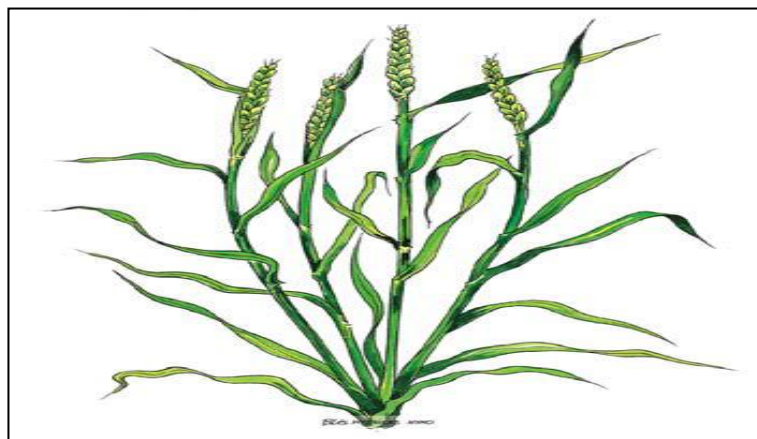
1.2.2. En Algérie :

Le blé est le produit de consommation de base, l'Algérie avec près de 600 grammes par personne et par jour (Abis, 2012). L'Algérie à importer de grosses quantités de céréales notamment le blé, elle est classé le troisième importateur mondial de blé (Rastoin & Benabderrazik, 2014).

1.3. Description botanique de la plante :

Les blés sont des plantes à feuilles alternes, formées d'une tige (chaume) portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis (figure : 01). A l'extrémité des chaumes, les épillets sont constitués de fleurs petites et peu visibles. Les fleurs sont dépourvues de pétales et entourées de deux glumelles. Chaque fleur contient trois étamines et un ovaire surmonté de deux styles plumeux. La fleur du blé est dite *cléistogame*, c'est-à-dire que, le plus souvent, le pollen est libéré avant que les étamines ne sortent de la fleur. Il s'attache alors aux stigmates, où peut se produire la fécondation.

L'autofécondation constitue donc le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés. Après fécondation, l'ovaire donnera le grain de blé. Dans le cas du blé, le grain est à la fois le fruit et la graine. Les enveloppes du fruit sont soudées à celles de la graine, on appelle ce type de fruit un caryopse.



Source : (Boutigny, 2007).

Figure 01 : la morphologie du plant de blé

1.4. Composition chimique des grains :

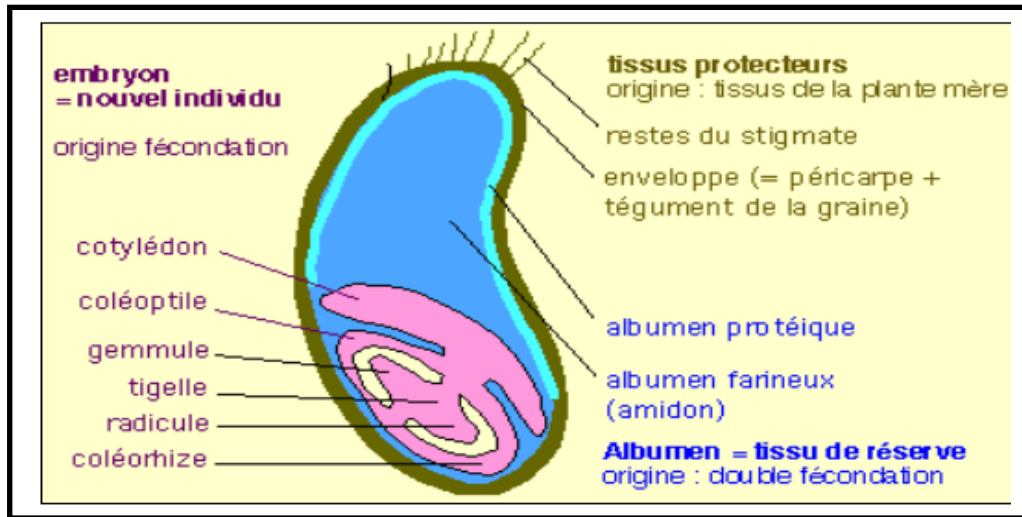
Le grain est composé de matières minérales et de matières organiques (Ndiay, 1999), on retrouve :

- **Les glucides** : Il est principalement constitué d'amidon, qui est un glucide complexe, environ 70% (Feillet, 2000) et d'autres glucides simples comme le glucose, le fructose, le saccharose et le raffinose (Fredot, 2012).
- **Les protéines** : Il contient entre 10 et 15% de protéines selon la variété, elles sont divisées en deux types, protéines de structure et de fonction (Battais *et al.*, 2007).
- **Les lipides** : Les grains du blé sont naturellement pauvres en lipides : Ils en contiennent seulement 2 %, essentiellement localisés dans le germe et l'assise protéique (Fredot, 2012).
- **L'eau** : Le grain du blé mûr est constitué de 13.5% d'eau, cette faible teneur lui permet d'être stocké longtemps en évitant le développement de micro-organismes en particulier les moisissures (Feillet, 2000).
- **Les minéraux** : Ils sont présents dans les grains en faible quantité. Les principaux sont le phosphore, le potassium, le manganèse et le cuivre, ils sont souvent associés ou présents sous forme de sels tels que les phosphates, chlorures ou sulfates.
- **Les vitamines** : Ce sont des éléments cliniques complexes jouant un rôle important dans la nutrition. Dans le grain, elles sont concentrées au niveau du germe et des enveloppes (Ndiaye D.S.B., 1999).

Tableau n° 01 : Principaux constituants du grain du blé

Partie du grain	% du grain	Composition en pourcentage
Enveloppes	9%	Cellulose : ≥ 20
Assise 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 : (Roudaut *et al.*, 2005).



Source : (Mossiniak, 2006).

Figure 02 : Schéma d'un grain de blé

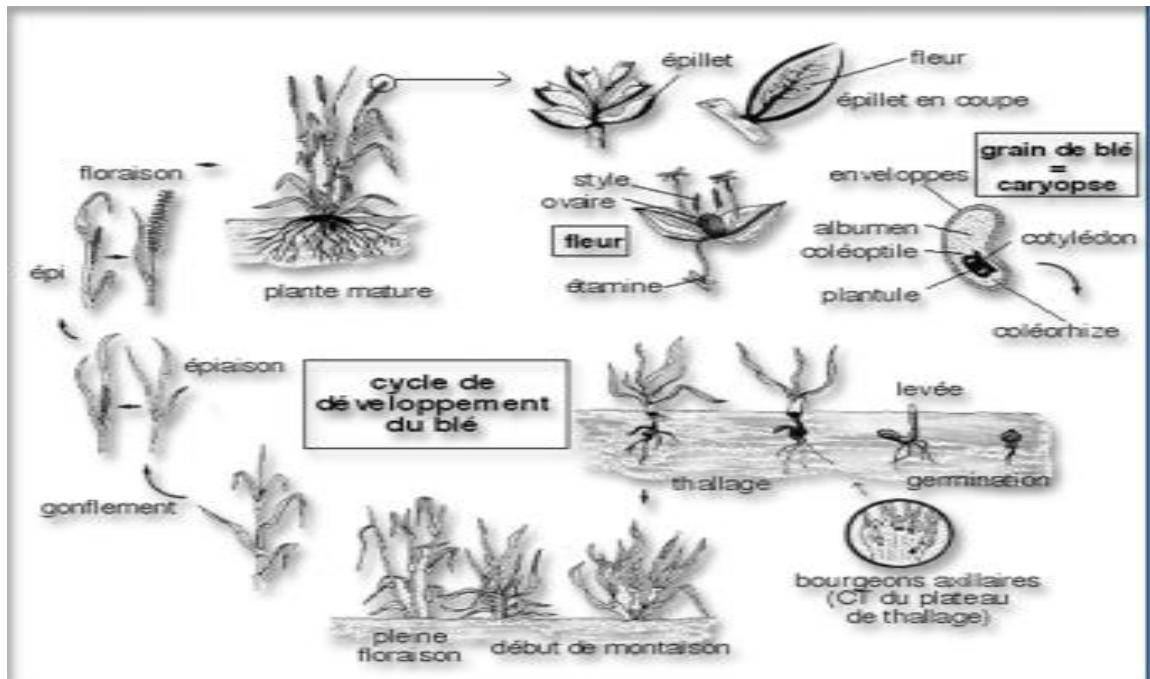
1.5. Cycle de développement du blé :

Selon (Bouffenaar *et al.*, 2006). Le cycle de développement est le même pour toutes les céréales. Le cycle de développement du blé est jalonné par une série de transformations qui concernent la tige et l'épi, ces modifications phénologiques sous l'effet des températures, des photopériodes accumulées par la culture depuis sa germination. On distingue trois périodes essentielles durant le cycle de développement du blé :

15.1. Période végétative : où la différenciation des racines et des feuilles est connue, cette période contient la germination, la levée, le tallage et la montaison.

1.5.2. Période reproductrice : elle connaît ou caractérisée par l'épiaison et la floraison.

1.5.3. Période de maturité : Le cycle végétatif s'achève par la maturation qui dure en moyenne 45 jours. Les grains vont progressivement se remplir et passer par différents stades tels que la Maturité laiteuse, la Maturités pâteuses et la Maturité complète.



Source : (henry et DE buyser, 2000).

Figure 03 : Schéma illustrant le cycle de développement de blé

1.6. Pathologie de la plante :

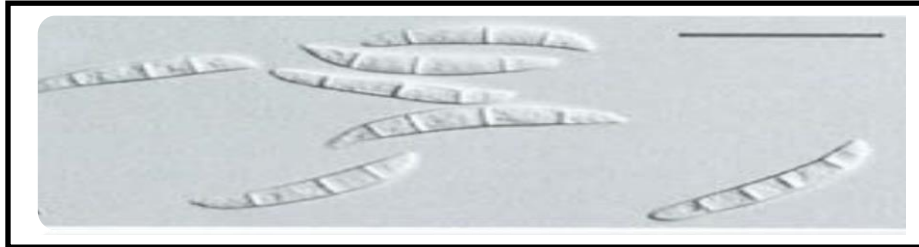
Le blé peut être attaqué par de nombreuses maladies à différents stades de son développement, ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes. (Ezzahiri, 2001).

Les maladies fongiques ont une influence sur le rendement puisqu'elles contaminent pour certaines une partie de la feuille voire la totalité (ex : la septoriose) ce qui inhibe le rendement photosynthétique. Certaines maladies affectent les épis et les grains (ex : la carie, le charbon et la fusariose). De plus, certaines espèces fongiques synthétisent des mycotoxines qui s'accumulent dans les grains, c'est le cas pour la plupart des espèces responsables de la fusariose.

2. La fusariose du blé:

La fusariose été décrite pour la première fois en 1884 en Angleterre, les fusarioses du blé sont causées par un complexe fongique de deux genres : *Fusarium* et *Microdochium* (Simpson *et al.*, 2001). Selon Gelinis (1995), le nom *Fusarium* vient de « *fusus* » qui signifie fuseau d'après la forme de ces macroconidies fusiforme et cloisonnées (Fig04). On distingue près de 40 espèces largement répandues dans la nature.

L'impact économique de la fusariose est attribuée aux réduction de rendements, produisent des mycotoxines contaminants les denrées alimentaires et provoquant alors des maladies graves chez les herbivores (mycotoxicoses) (Chabasse *et al.*, 2002). Ils réduisent la qualité des céréales et compromettent la valeur boulangère du blé, elles ont besoin d'une humidité élevée pour croître (Abramson *et al.*, 2001).



Source : (Leslie et Summerell, 2006).

Figure 04 : Spores de *F.culmorum*

2.1. Symptomatologie :

Lorsque les conditions climatiques sont favorables, la fusariose peut attaquer à tous les stades de développement et tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis.

La fusariose des céréales regroupe trois types de symptômes (Parry *et al.*, 1995).

- "Seedling Blight" : fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fontes des semis.
- "Foot Rot" : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus.
- "Head Blight" : fusariose de l'épi.

Notre travail concerne plus particulièrement la fusariose de l'épi.

Les grains de céréales infectées par *Fusarium* peut entraîner des symptômes de fontes de semis ainsi qu'une diminution du nombre d'épi et du poids des grains (Pirgozliev *et al.*, 2003). La fusariose des épis de blé est caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée, ils apparaissent alors blanchâtres. Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose. Si l'infection est plus tardive, les grains peuvent être de taille normale mais ils se décolorent en rose. (Ballois, 2012).



Figure 05 : Des épis de blé fusariés

Source : (Dorothee siou, 2013).



A

B

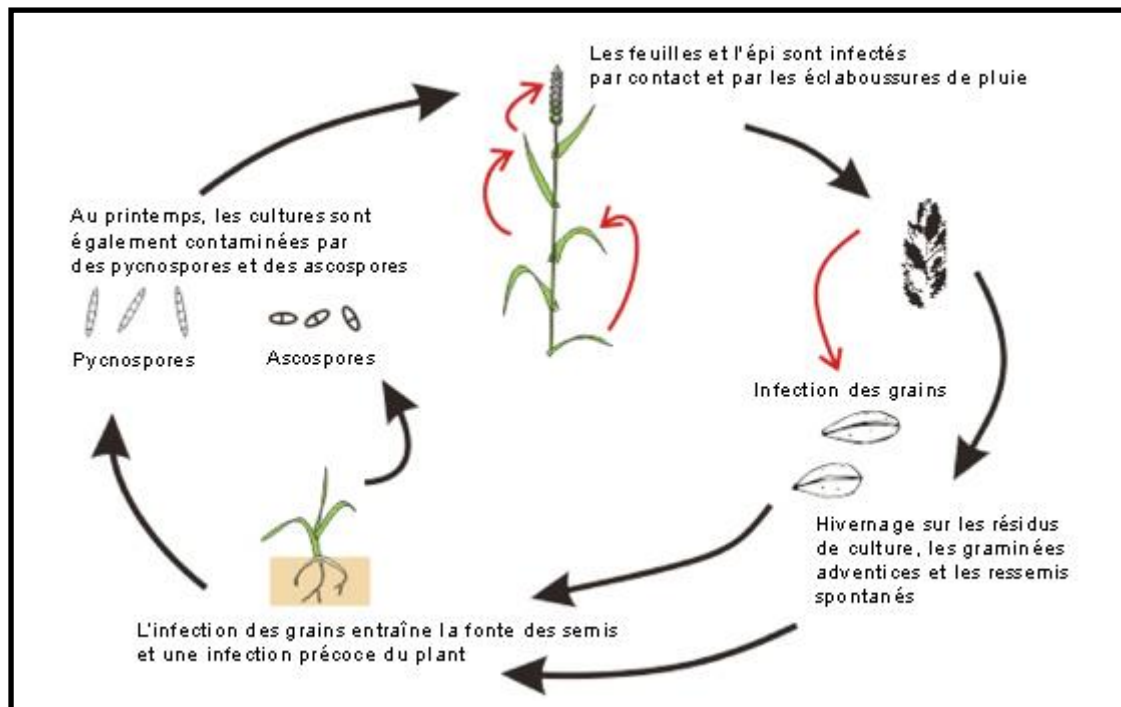
Figure 06 : Grains seins (A) et fusariés (B) du blé

Source : (Boutigny 2007).

2.2. Cycle de développement :

La principale source d'inoculum des fusarioses est constituée par les résidus de culture antérieure infectée (Sutton, 1982 ; Parry *et al.*, 1995). D'autres sources d'inoculum sont les nombreuses autres plantes hôtes, les semences contaminées et le sol (Champeil *et*

al., 2004). *Fusarium* est capable de survivre durant l'hiver dans le sol et sur les débris végétaux sous forme d'un mycélium saprophyte ou de chlamydozoospores, selon les espèces (Parry *et al.*, 1995). Au printemps, les conditions climatiques chaudes et humides seraient favorables au développement des conidies (spores asexuées) et des périthèces qui produisent des ascospores (spores sexuées) au moment de la floraison des céréales. Les ascospores seraient vraisemblablement la source d'inoculum de l'épidémie (Caron *et al.*, 2006).



Source : http://www.agro.basf.fr/agroportal/fr/fr/cultures/les_cereales/la_protection_phyto_du_ble/les_maladies_ravageurs_et_adventices/les_maladies/Septoriose_Brulure_des_semis.html.

Figure 07 : cycle biologique de *Fusarium*, principal agent responsable de la Fusariose des épis de blé

3. Les mycotoxines :

Se sont des molécules toxiques produites à partir des métabolites secondaires synthétisés par des champignons du genre *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *pénicillium* (Steyn, 1995).

Les mycotoxines sont restées négligées jusqu'au début des années 1960, lorsque une terrible épidémie est survenue en Angleterre et qu'en l'espace de quelques mois plus de cent milles dindons sont morts. La cause de la maladie a été imputée à facteur toxique présent dans la farine d'arachide brésilienne, utilisée comme source de protéine pour l'alimentation animale. Le facteur toxique semblait être produit par deux champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Sargeant *et al.*, 1961). Les espèces de

Fusarium produisent différents types de mycotoxines parmi lesquelles les plus fréquentes sont les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone (Prandini *et al.*, 2009).

Ces mycotoxines ne sont pas connus uniquement au champ, mais également lors du stockage du grains si l'eau est disponible (Langseth *et al.*, 1997).

3.1. Les trichothécènes :

Les trichothécènes constituent le groupe de mycotoxines produites par *fusarium* le plus important avec de 150 trichothécènes isolés chimiquement. Seuls les trichothécènes de types A et B semblent avoir une importance sur les cultures de céréales (Smith *et al.*, 1990). Les principales mycotoxines produites par le genre *fusarium* et en particulier le complexe d'espèces *fusarium graminearum* sont les trichothécènes B, notamment le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV) et leurs dérivés acétylés (Wang *et al.*, 2011).

Les trichothécènes sont toxiques pour l'homme et pour l'animal. Les risques résultant de l'exposition (chronique) sont considérés comme un problème majeur en santé publique et en médecine vétérinaire. (Balzer, 2004).

Ueno (1985) a classé les trichothécènes en quatre groupes, en fonction de leurs structures chimiques. Les TCT A ont un groupe fonctionnel autre qu'une fonction cétone en C-8 et sont représentés par la toxine T-2.

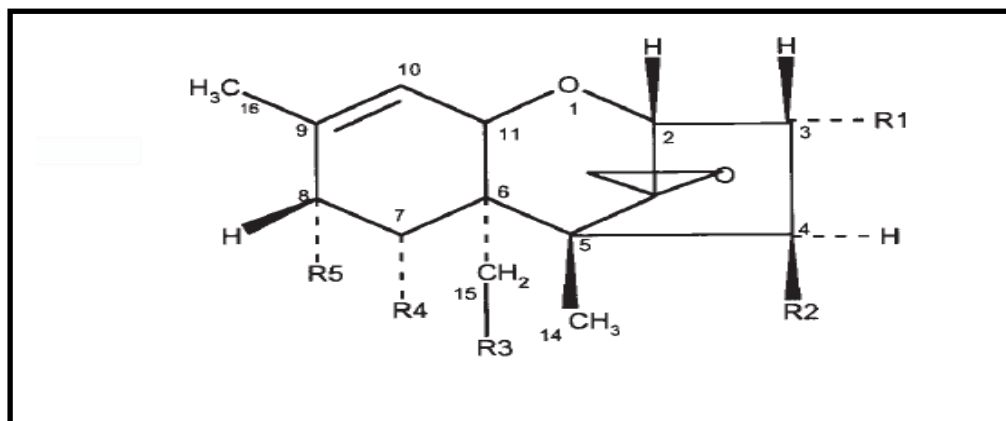
Les TCT B ont une fonction cétone en C-8 et sont représentés par le déoxynivalenol et le nivalenol. Les TCT C sont caractérisés par un second cycle époxyde en position C-7,8 ou C-9,10. Les TCT D incluent des trichothécènes macrocycliques qui contiennent un cycle entre les positions C-4 et C-15. Sur substrats naturels, les trichothécènes les plus souvent isolés sont ceux des groupes A et B. Les mycotoxines de *Fusarium* les plus fréquemment rencontrées lors de la fusariose du blé en Europe sont les trichothécènes de type B (Bottalico et Perrone, 2002). Les TCT B comprennent, entre autres, le déoxynivalenol (DON) et ses formes 15- et 3-acétylés (15-ADON et 3-ADON), le nivalenol (NIV) et sa forme acétylée la fusarenone X (FX).

3.1.1. Les propriétés physico-chimiques des trichothécènes :

Les trichothécènes se présentent sous la forme de poudre 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, les trichothécènes ne présentent pas des 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 spécifiques, cette propriété est utilisée pour leur dosage en chromatographie liquide à haute pression (CLHP).

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 et parfois légèrement solubles dans l'eau.



Source : (Ponts, 2005).

Figure 08: Structure générale des trichothécènes

3.1.2. La toxicité :

La toxicité aigue des trichothécènes vis-à-vis des mammifères est bien documentée (pour revue, voir D'Mello *et al.*, 1999 ; Bennett et Klich, 2003 ; Eriksen, 2003). Les trichothécènes ont été reconnus responsables d'intoxications humaines, et en particulier de l'aleucie toxique alimentaire, survenue en Russie dans les années 1942-1947 (Joffe, 1983).

Les trichothécènes sont toxiques envers toutes les espèces animales testées. Les symptômes varient selon les espèces, le temps d'exposition et les teneurs en mycotoxines ingérés. Les effets toxiques des trichothécènes incluent un retard de croissance, une réduction des fonctions ovariennes et des désordres au niveau de la reproduction, des troubles de l'immunité (Rocha *et al.*, 2005).

En épidémiologie, les analyses indiquent que 20 à 50% du cancer humain est dû par voie orale, et par contact cutané (Strickland et Groopman, 1995, Williams *et al.* 2004). Chaque mycotoxine possède son propre effet nocif tant sur la santé animale que sur la santé humaine (Hussein et Brasel, 2001). Les symptômes varient selon l'âge, l'espèce, le sexe, l'effet hormonal et le régime nutritionnel.

3.1.3. La Règlementation :

La Commission européenne a publié un règlement fixant des limites maximales en DON dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine. Toutefois, il convient de développer des méthodes de multidétection rapides et compatibles avec les limites réglementaires.

Cependant, la Commission recommande d'appliquer des teneurs maximales dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation animale, le teneur maximal en DON dans le blé est de 1 750 µg/kg. Pour le blé tendre, une limite maximale de 1,25mg/kg du DON (FAO, 2013).

En Algérie, les teneurs en mycotoxines dans les aliments ne sont pas encore réglementées.

3.2. Principales méthodes de détection et de quantification des mycotoxines :

Les mycotoxines se trouvent généralement à l'état de traces dans les matières premières céréalières, et leur mise en évidence est délicate (Cahagnier, 1998).

Il existe différentes méthodes qui permettent l'analyse des mycotoxines dans les denrées alimentaires. Tels que la Chromatographie sur couche mince (CCM), elle constitue la méthode de base, qui permet une séparation efficace des produits (Frayssinet et Frémy, 1991). Il existe aussi La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui utilise des gaz comme phase mobile pour la séparation des composés (Arbault et Daussant, 2005). La Chromatographie liquide haute performance (HPLC) constitue une méthode de référence, permettant la quantification et l'identification des contaminants présents à des teneurs très faibles (Xie et al., 1997).

Les testes immunologiques se sont des teste rapides dans la détection des mycotoxines (Gathumbie et al, 2003). Selon (Arbault et Daussant, 2005). Trois types de teste immunologiques sont employés notamment Les testes RIA (radioimmunoassay), Les testes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et Les testes IAC (immunoaffinity column assay).

4. Composés phénoliques :

4.1. Généralité :

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (Macheix *et al.*, 2005).

En effet, à côté des métabolites primaires (glucides, protéines et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables (Herbert, 1989).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. (Marouf, 2000; Macheix *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont une classe qui constitue 8000 composés, ils sont divisés en plusieurs catégories tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes (SFA, 2005).

4.2. Les principales classes de composés phénoliques :

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (Herbert, 1989; Macheix *et al.*, 2005; Beta *et al.*, 2005).

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches.

Tableau n° 02 : Les principales classes de composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemples
C6	Phénols simples	Catéchol
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol

Source : (Harborne, 1980; Macheix *et al.*, 1990)

4.3. Rôles, intérêts et propriétés des composés phénoliques :

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante, ils peuvent en effet intervenir dans la fertilité, la pigmentation, la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques et encore la formation de polymères structuraux comme la lignine (Guignard *et al.* 1985; Maury et Legrand 2000; Brouillard *et al.*, 1997; Macheix *et al.*, 2005). Les acides phénoliques des

parois cellulaires jouent également un rôle très important dans les liaisons des polysaccharides avec les autres composés des parois cellulaires, incluant la lignine par des liaisons ester et éther.

4.4. Les acides phénoliques et les mécanismes de résistance des grains de blé à la fusariose :

Les acides phénoliques sont présents chez toutes les plantes et leurs rôles dans les mécanismes de résistance a été décrits par de nombreux chercheurs (Friend, 1981 ; Bell, 1981 ; Matern et Kneusel, 1988 ; Nicholson et Hammerschmidt, 1992 ; Métraux et Raskin, 1993). Ils interviendraient dans les mécanismes de défense des plantes en tant que constituants des parois cellulaires, en tant que composés antimicrobiens constitutifs des plantes ou induits en réponse à l'infection et en tant que molécule signal (Métraux et Raskin, 1993).

La paroi végétale constitue une véritable barrière physique de défense contre les pathogènes. En réponse à l'infection, les acides phénoliques seraient synthétisés rapidement par la plante et polymérisés dans les parois cellulaires (Matern et Kneusel, 1988). Les acides phénoliques estérifiés aux polysaccharides consolident et stabilisent les parois cellulaires.

Partie II : Matériel et Méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Neuf variétés de blé tendre et de blé dur ont été utilisées dans notre travail. Les échantillons qu'on a ramené ont été conservés dans des sacs en papier à 4°C jusqu'à leur utilisation. Le tableau n° 04 nous renseigne sur les différentes variétés avec leurs origines et leurs cycles biologiques.

Tableau n°03: Présentation des échantillons du blé collectés

especes	Variétés	Provenance	Cycle biologique
Blé dur	Cham 3	CNCC	précoce
	Ardente	CNCC	précoce
	Chané s	CNCC	précoce
	Belikh 02	CNCC	précoce
	Ofanto	CNCC	tardive
	Gangoum el rakhma	Bou-sâada	tardive
Blé tendre	Djemila	CNCC	précoce
	Mimouni	CNCC	tardive
	Mahon Demias	CNCC	précoce

2.2. Matériel fongique.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux souches de *Fusarium culmorum* DE chémotypes différents NIV et DON (tableau n°04),

Tableau n°04: Liste des différents isolats Fusariens utilisés.

N° de la souche	Code expérimentale	Espèce	Organe d'isolement	chémotypes
<u>N01</u>	<u>T706</u>	<i>F.culmorum</i>	<u>épis</u>	<u>NIV/FX</u>
<u>N02</u>	<u>BD11</u>	<i>F.culmorum</i>	<u>épis</u>	<u>DON/3Adon</u>

Source (Originale, 2017).

2.3. Isolement des *Fusarium* à partir de grains de blé

2.3.1. Méthodes d'isolement

Pour l'isolement des *Fusarium*. Les grains de blé ont subi une désinfection superficielle en vue d'éliminer la mycoflore externe saprophyte, pour cela les grains ont été trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à une concentration de 2% pendant 3 mn, puis rincés trois fois à l'eau distillée stérile pendant 3 mn. Les grains ainsi désinfectés ont été séchés sur un papier filtre stérile, puis déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu DCPA (*DichloranChloramphenicol Peptone Agar*), ce milieu ne permet pratiquement aucune pigmentation du thalle des champignons qui s'y développent. Les cultures apparaissent donc généralement blanches à rose très pâle. Sur le milieu étant semi sélectif, seuls les champignons du genre *Fusarium* vont se développer de manière conséquente sur le milieu. Après, ces dernières ont été incubées dans l'étuve à 25 °C. Les notations ont été faites à partir du 4^{ème} jour. Les colonies ayant une couleur blanche ou rose ont été prises en considération.

Afin de purifier les isolats obtenus de l'isolement, des repiquages successifs sur milieu de culture PDA (*PotatoDextrose Agar*), ont été réalisés dans le but d'obtenir des cultures pures de l'isolat cherché. En suite des cultures monosporales ont été réalisées à partir de chaque colonie avant l'identification morphologique. les champignons, une fois purifiés, sont conservés dans des boîtes pétri sur 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 signe, puisse être identifié sans ambiguïté (Dave et al., 1997). Une fois repiqués dans les boîtes sont incubés à température ambiante pendant 12 jours et conservé à 4 +/- 1°C (Bensmira, 2006).

2.3.2. Identification morphologiques :

L'isolat sur PDA a été observé pour déterminer leurs caractéristiques morphologiques à savoir la densité, la forme de la colonie, la pigmentation du mycélium (Lesslie *et al.*, 2006).

2.3.3. Identification macroscopique :

L'observation se fait à l'œil nu, à l'aide d'une loupe binoculaire en se basent essentiellement sur l'aspect culturale des isolats et la coloration du mycélium sur milieu PDA. Le diamètre de la colonie, de leur revers.

2.3.4. Identification microscopiques :

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

Les caractéristiques microscopiques ont été déterminées par observation de la forme, de la taille, de la septation des macroconidies, ainsi que l'observation des types de spores développées.

2.4. Identification moléculaire des espèces fongiques

Compte tenu de la difficulté de l'identification morphologique des espèces de *Fusarium* et *Microdochium*, les cultures monosporales ont fait l'objet d'une identification moléculaire. Cette dernière a été basée sur l'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant des amorces spécifiques.

2.4.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été faite selon le protocole d'extraction de l'ADN avec DNeasy Plant Mini Kit (50) – Qiagen - Cat No 69104 au laboratoire de phytopathologie de CNCC. Environ 150 µl de mycélium broyés ont été incubés dans 500 µl de tampon TES (100 mM Tris-HCl ; pH 8,0 ; 10 mM EDTA ; 2% SDS) et 4 µL de protéinase K pendant 30 min à 55 °C, puis dans 140 µL NaCl (5M) et 65 µL CTAB (10%) pendant 10 min à 65 °C. L'ADN a été extrait dans 700 µL de chloroforme: isoamylalcool (24:1), centrifugé (12,000 rpm ; 5 min), et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Après incubation dans 3 µL de RNase (10 mg/ mL) pendant 30 min à 37 °C ensuite dans 150 µL d'acétate d'ammonium (7,5 M) pendant 30 min sur de la glace, le mélange a été centrifugé (12,000 rpm ; 1 min). La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube contenant 500 µL d'isopropanol pour précipiter l'ADN. Le culot récupéré par centrifugation (12,000 rpm ; 5 min) a été asséché à l'air puis lavé deux fois avec 500 µl d'éthanol 70% (-20 °C). Enfin, l'ADN a été dissout dans 25 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA pH 8,0) puis quantifié après migration sur gel d'agarose 1% dans le tampon TBE 0,5X (45 mM Tris-Borate, pH 8,3 ; 1 mM EDTA pH 8,0) en comparant l'intensité des bandes par rapport à un témoin d'ADN de lambda de concentration connue. L'ADN ainsi extrait et quantifié a été conservé à -20 °C.

2.4.2. Amplification spécifique par PCR

L'amplification spécifique par PCR a été réalisée dans une réaction mixte de volume 25 µl contenant 25 ng d'ADN, 10 X tampon *Taq* polymérase (10 mM Tris-HCl ; pH 7,5 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM Mg Cl₂), 200 µM de chaque dNTP, 1 µM du couple d'amorce de chaque espèce et 1,5 U de *Taq* polymérase. Le couple d'amorce utilisé pour l'identification de *F.culmorum* OPT18F/ OPT18R (GATGCCAGACCAAGACGAAG/GATGCCAGACGCACTAAGAT). L'amplification d'ADN a été conduite dans un thermocycleur (Biometra, T-1, Göttingen, Germany) en utilisant les programmes décrits par Nicholson *et al.* (1998). La migration des produits amplifiés a été réalisée sur gel d'agarose 1,5%. Les programmes utilisés pour l'amplification des ADN de *F. culmorum*. Une dénaturation à 94 °C/2 min, le nombre de cycle fixé à 40 cycles 94 °C/1 min, 55 °C/1 min et 72 °C/2 min. Une extension finale de 72 °C/5min.

2.5. Evaluation de la sensibilité variétale vis-à-vis de *Fusarium culmorum*

Le 23 Décembre 2016. Dans une exploitation privée dans la wilaya de Laghouat. Les variétés utilisées sont de nombre de neuf, ces variétés inscrites au catalogue officiels au 2015 mais ils n'ont pas testées vis-à-vis le fusariose (il existe plusieurs variétés et nous avons choisi neuf variétés selon les produits qu'ils existent). Le dispositif expérimental adopté est de type bloc aléatoire complet (BAC), Neuf traitements avec trois répétitions. Alors, le nombre des unités expérimentales sont vingt-sept

L'essai a été réalisé dans des pots en plastiques (15/15cm²) à raison de 5 grains par pot (pour assurer leur germination). Contenant un substrat constitué de 1/3sable, 1/3 terreau et 1/3 argile.

2.5.1. Préparation de la suspension sporale

Pour préparer la suspension sporale nous avons utilisé un seul isolat du *Fusarium*, de chémotype DON/Adon

Des fragments du milieu d'une culture âgé de 10 jours (période nécessaire de développement). L'isolat sur le PDA ont été met dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée, les tubes ont été agités à l'aide d'un vortex pour libérer les spores. La

concentration de la suspension a été estimée par un hématimètre de *Malassez* puis ajustée à 10^6 UFC/ml (figure n° 09).

2.5.2. Inoculation

L'inoculation a été réalisée au stade floraison par pulvérisation de la suspension sporale jusqu'à ruissellement de l'épi. Cette opération a été effectuée à l'aide d'un pulvérisateur donnant un jet homogène et continu. Une fois inoculées, les épis ont été couverts par des sachets en plastique pour le maintien d'une humidité relative supérieure à 90%. Le suivi des épis inoculés à été fait une semaine après l'inoculation pour observer le développement des symptômes.

Deux notations ont été réalisées. en se basant sur un échelle de notation de Michel (2001) de 0 à 9, sachant que 09 correspond à une sensibilité maximale et 0 à l'absence totale des symptômes (tableau n° : 06).

Tableau n° 05: Echelle d'évaluation utilisée pour l'estimation l'infection Par *Fusrium* sur épi,

Note	Partie de l'épi infecté	Description des symptômes
1	0.5%	Sans symptômes.
2	2.5%	Traces de symptôme, un épillet sur 10 épis montre des symptômes.
3	10%	10% des épillets de chaque épi sont infectés.
4	25%	Un quart des épillets épi sont infectés.
5	50%	La moitié des épillets d'un épi sont infectés.
6	75%	Trois quarts des épillets sont infectés.
7	90%	10% des épillets d'un épi ne sont pas infectés.
8	97.5%	Peu d'épillets d'un épi ne sont pas infectés.
9	100%	Tous les épis sont morts.

Source : Michel, (2001) (In Mascher et al, 2005).

2.6. Extraction des acides phénoliques à partir des épis de neuf variétés de blé au stade floraison

2.6.1. Essai au champ pour la caractérisation biochimique des variétés de blé

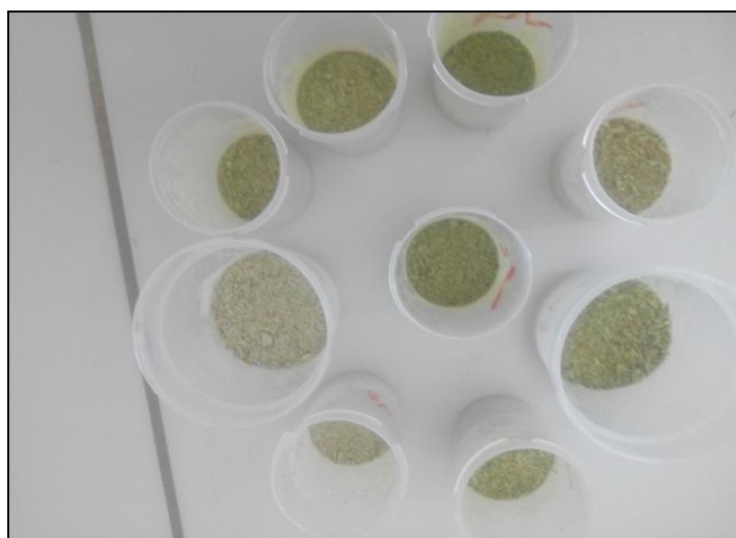
L'essai à été réalisé en plein champ le 23 Décembre 2016. Dans une exploitation privée dans la wilaya de Laghouat. Les variétés utilisées sont de nombre de neuf. Avec des niveaux de sensibilité différente à la fusariose. Le dispositif expérimental adopté est de type bloc aléatoire complet (BAC), Neuf traitements avec trois répétitions. Alors, le

nombre des unités expérimentales sont vingt-sept (27) unités dont chaque variété a été semée dans une parcelle élémentaire ayant des dimensions 1,20 m x 1m. Cette dernière a été divisée en 3 lignes espacées de 40 cm les unes des autres et l'espacement entre chaque plante est 30 cm. la surface totale occupée par l'essai est de $9 \times 3 \times 1,20 \text{ m}^2 + 0,6 \text{ m} \times 9 = 37,8 \text{ m}^2$.

Les épis récoltés au stade floraison ont été séché à l'air libre .Ensuite nous les avons placé dans des sacs en papier étiquetés pour les transporté au laboratoire pour l'extraction des composés phénoliques.

2.6.2. Extraction des composés phénoliques liés

Les composés phénoliques liés, par des liaisons Ester, ont été extraits à partir d'épis récoltés au stade floraison, séché à l'air libre puis broyé à l'aide d'un broyeur. Par la suite, une quantité de 100 mg a été introduite dans un Corning, au quelle nous avons ajouté 4 ml d'une solution de NaOH (8%). Après 2 heures d'agitation à l'aide d'un Shaker, le pH a été ajusté à une valeur de 2-3, puis nous avons ajouté un volume de 5 ml d'acétate d'éthyle, et centrifugé le mélange pendant 5 mn à une vitesse de 5000 tours / mn, 4 ml du surnageant est récupéré, puis, 5 ml de l'acétate d'éthyle est ajoutée au reste du mélange qui est centrifugé une deuxième fois, pour récupérer 4 ml du surnageant, cette quantité est ajouter au premier 4 ml pour obtenir 8 ml du surnageant qui est par la suite évaporer à sec sous flux d'azote à une température de 40 °C.



Source : (Originale, 2017)

Figure n° 09 : poudre obtenue après le broyage de matériel végétal.



Source (Originale, 2017).

Figure n°10 : Préparation de surnageant pour l'extraction.

L'extrait sec est repris avec 0l ml de méthanol/eau (1/1.v/v). Puis l'analyse de mycotoxine par CCM.

2.6.3. Analyse chromatographique sur couche mince

Celle-ci a été réalisée en utilisant des plaques de CCM prêtes à l'emploi comportant déjà une couche de 0,25mm de gel de silice (Trucksess, 1984 et IPCS, 1990).

Le système choisi pour la phase aqueuse est réalisée par le système solvant 50/20/25: H₂O distillée/n Butanol/EtOH. L'éluant est versé jusqu'à une hauteur de 1cm dans une cuve à élution ferme hermétiquement jusqu'à saturation en vapeur. Le dépôt des échantillons se fait à l'aide d'une pipette capillaire en verre, ou un trait de 3 mm est marqué au crayon à environ 2 cm du côté inférieur de la plaque. Le diamètre de la tâche produite est séché rapidement entre chaque application. La plaque placée verticalement dans la cuve doit demeurer fermée et ne doit pas être déplacée. Lorsque le front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve. Le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin. La plaque est séchée à l'air libre.

2.7. Effet modulateur des acides phénoliques sur la production des mycotoxines

Le milieu utilisé pour les cultures liquides statiques a été mis au point par (Boutigny, 2008). Ce milieu contient 20 g/L de glucose, 0,5 g/L de KH_2PO_4 , 0,6 g/L de K_2HPO_4 , 0,017 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2.7.1. Conditions de cultures sur milieu liquide et supplémentation en acide phénoliques

L'effet de l'acide phénolique a été testé dans des cultures réalisées dans des flacons contenant de milieu de culture liquide MS (*MycotoxinSyntheticMedium*) de Vogel (1956) inoculées avec une suspension de spores à la concentration finale de 10^6 spores / ml.

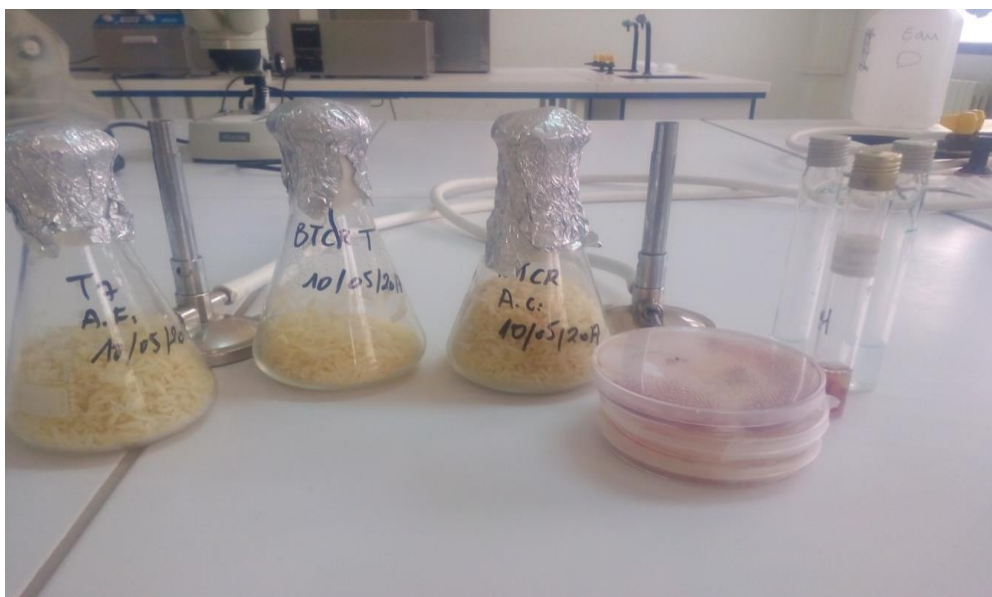
Le milieu de culture liquide MS a été réparti aseptiquement dans des fioles erlenmeyer de 250 ml à raison de 150 ml pour chacun. Ces derniers, ont étéensemencés par 150 μl de la suspension des spores de chaque isolat. Des doses de 13,5 mg de l'acide Caféique et de 14,6 mg de l'acide Ferulique, ont été dissoutes directement dans le milieu MS près d'une flamme. Deux erlenmeyers contenant uniquement le milieu et la suspension sporale sont considérés comme témoins. L'ensemble des erlenmeyers ont été portés à l'incubation pendant 15 jours à 25°C.

❖ Extraction des TCTB à partir de milieu liquide MS

Les étapes de l'extraction des mycotoxines TCTB consistait à prélever 50 ml du milieu de culture MS, au quel est ajouté un volume de 100 ml d'acétate d'éthyle, puis le mélange est agiter au vortex pendant 1 mn. Après décantation, nous avons prélevé la phase surnageant et l'évaporer au Rota vapeur de 40°C. L'extrait sec est repris avec 2 ml de méthanol/eau (1/1, v/v).

2.7.2. Conditions de cultures sur milieu solide et supplémentation en acide phénoliques

Le riz utilisé comme substrat solide a été mis dans de l'eau distillée pendant 48h à 4°C, puis nous avons l'autoclavé à 120°C pendant 20 min) a été réparti dans des fioles erlenmeyer de 250 ml à raison de 150 g pour chacun. Ces derniers, ont étéensemencés par 150 μl de la suspension des spores de chaque isolat au quel est ajouté soit 13,5 mg de l'acide Caféique, 14,6 mg de l'acide Ferulique, avec un erlenmeyer contenant uniquement le riz stériliséensemencé par la suspension des spores comme témoin. L'ensemble des erlenmeyer ont été Après incubation pendant 21 jours à une température de 25 °C.



Source (Originale, 2017).

Figure n°12 : L'inoculation d'un milieu solide supplémenté en acides phénoliques.

Le riz est par la suite, a été séché dans une étuve à 40°C pendant 02 jours et broyé en poudre fine.

❖ Extraction des TCTB à partir de milieu solide

05g de grain broyé ont été Pesé dans un corning de 15ml, ont été extrait par un mélange de 25ml ACN/Eau (84 ml d'ACN et 16 ml d'eau), après agitation pendant 1h et centrifugation les phases organiques sont récoltées et évaporées à sec à l'aide d'un rotavapor. Les extraits secs sont alors stockés à -6 en attendant l'analyse. Après les extrais secs sont repris avec 02 ml de méthanol/eau (1/1, v/v).

Toutes les analyses ont été réalisées sur une chromatographie sur couche mince, La lecture a été effectuée sans et avec UV à 254 nm et 366 nm.



Source (Originale, 2017).

Figure n° 13 : Evaporation des extraits

2.8. Effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne

Pour tester l'effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne une expérience a été réalisée. Nous avons repiqué des boîtes de PDA supplémentées en acide férulique et caféique, puis nous avons préparé des disques de deux souches pour les déposés au centre des boîtes. L'incubation de ces boîtes faite dans une étuve pendant 10 jours à 25°C.

Partie III : Résultat et discussion

3. Résultats et Discussion

3.1. Isolements et identification morphologique

Plusieurs espèces fongiques, notamment de *Fusarium* et *Microdochium*, peuvent être impliquées dans la fusariose, L'identification de l'espèce impliquée est nécessaire pour un meilleur contrôle de la maladie.

Les résultats des isolements à partir de la graine montrent un taux de contamination faible par le *F. culmorum* pour les semences analysées.

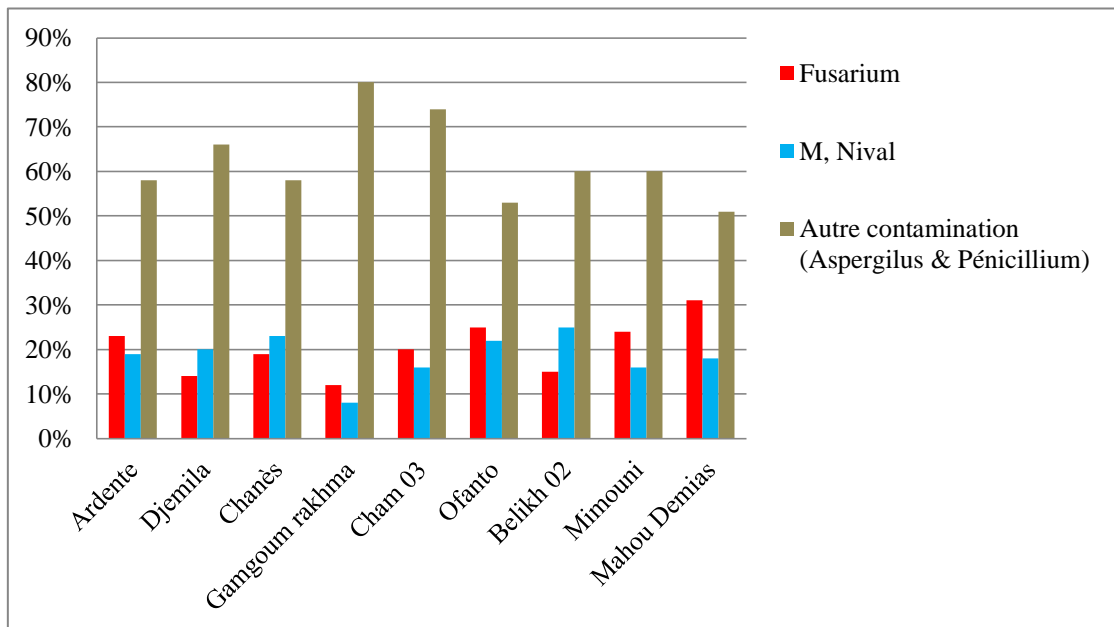
Tableau n° 06: Taux de contamination de différentes semences analysées.

Variétés	taux de contamination			Origine	Organe d'isolement	Année d'isolement
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Microdochium nivale</i>	<i>Aspergillus & Penicillium</i>)			
V01: Ardente	23%	19%	58%	CNCC	Grain	2017
V02: Djemila	14%	20%	66%	CNCC	Grain	2017
V03: Chanès	19%	23%	58%	CNCC	Grain	2017
V04: Gamgoum rakhma	12%	08%	80%	Bou-ssaâda	Grain	2017
V05: Cham03	20%	16%	74%	CNCC	Grain	2017
V06: Ofanto	25%	22%	53%	CNCC	Grain	2017
V07: Belikh 02	15%	25%	60%	CNCC	Grain	2017
V08: Mimouni	24%	16%	60%	CNCC	Grain	2017
V09: Mahon Demias	31%	18%	51%	CNCC	Grain	2017

Source : (Original, 2017).

Les résultats obtenus montrent que les deux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus abondants pour tous les échantillons de blé analysés. Une abondance très importante a été notée pour ces deux genres au niveau des variétés de blé V07: Belikh 02, V08: Mimouni, V02: Djemila, et V05: Cham03, V04: Gamgoum rakhma avec un taux de contamination respectivement de 60%, 60%, 66%, 74%, 80% par contre une présence moins importante a été observée chez les autres variétés avec un taux de contamination de 58%, 58%, 53% et 51% respectivement pour V01: Ardente, V03: Chanès, V06: Ofanto et V09: Mahon Demias.

Quant aux autres espèces de *Fusarium culmorum* et *Microdochium nivale*, les résultats mentionnés dans la (Figure n° 15) montrent que le taux de contamination de toutes les variétés de blé est plus important par les *Fusarium* spp par rapport au *Microdochium nivale*. Les variétés V01: Ardente, V08: Mimouni et V06: Ofanto sont les plus contaminées par les *Fusarium* spp avec un taux respectivement 23%, 24% et 25%. Par contre pour *Microdochium nivale* le taux de contamination à atteint 22 %, 23%, 25% pour les variétés respectivement V06: Ofanto, V03: Chanès et V07: Belikh 02.



Source : (Original, 2017).

Figure n° 14 : Présentation des pourcentages d'infestations des semences des variétés analysées.

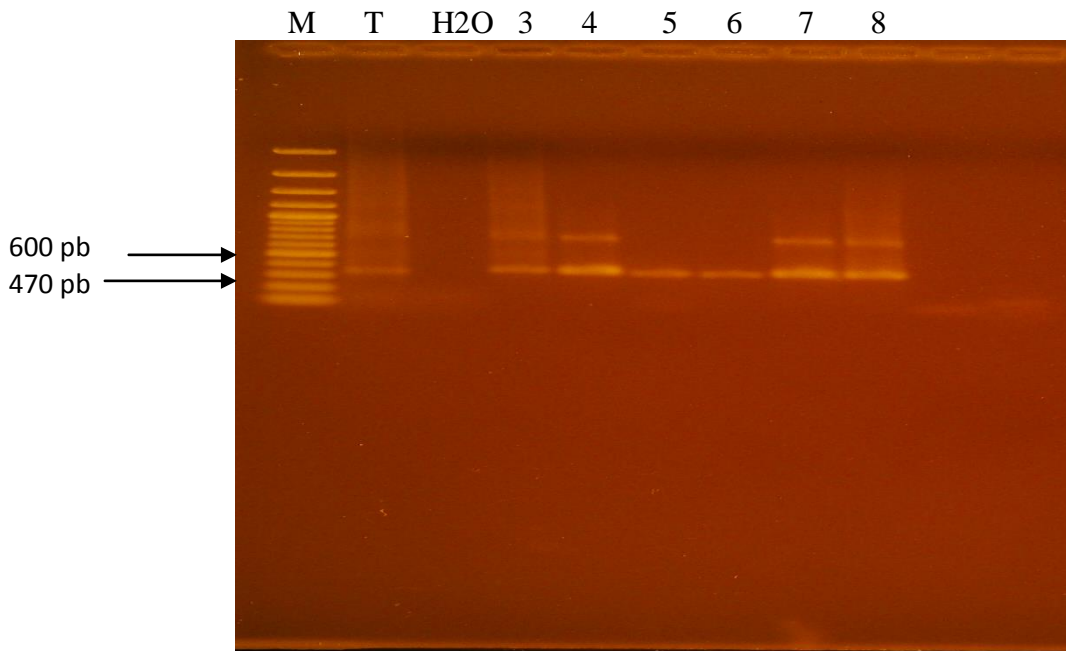
❖ Identification des champignons responsables de la fusariose du blé

Les colonies roses et blanches de *Fusarium* spp. Qui se sont développées sur DCPA ont été purifiées par repiquage successifs de ces champignons sur PDA, ainsi une identification basée sur l'analyse des critères généraux et morphologiques a été réalisée en utilisant la clé d'identification de Leslie *et al.* (2006).

Les résultats du tableau n° 12 ont montrés que les 09 variétés analysées, ont été infestés par les espèces des genres *Fusarium* et *Microdochium*. L'identification morphologique a montré la présence des espèces fongiques à savoir *M. nivale*, *F. culmorum*, D'autres champignons saprophytes ont été aussi isolés à savoir *Alternaria* spp. Et *Aspergillus* spp.

3.2. l'identification moléculaire :

L'identification morphologique des champignons isolés à partir des grains de blé a été confirmée par l'amplification spécifique par PCR en utilisant un couple d'amorce spécifique de *F. culmorum*. Les résultats ont montré que le couple d'amorce (OPT18F/OPT18R) a amplifié les bandes 470 pb spécifiques de *F. culmorum* (Schilling *et al.*, 1996).



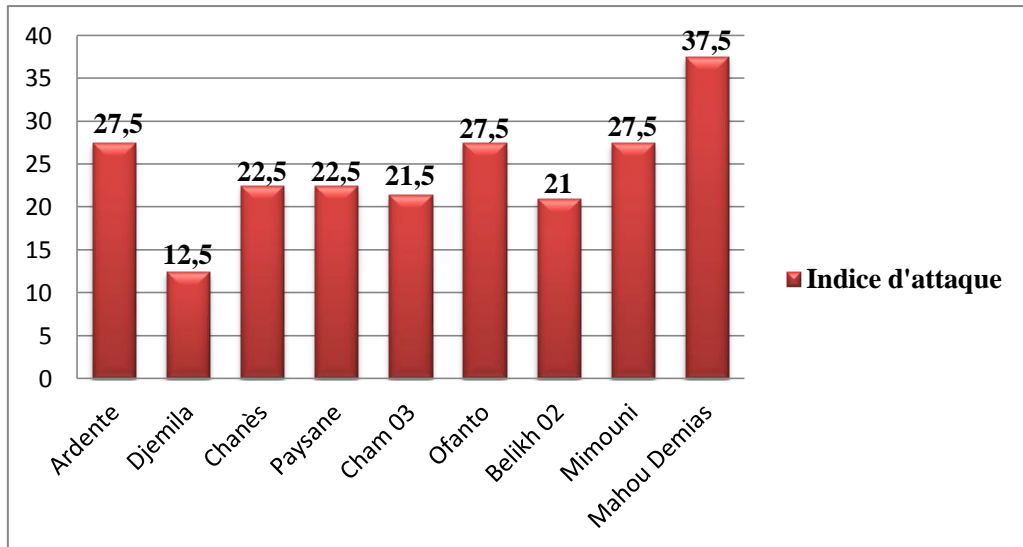
Source : (Originale, 2017).

Figure n° 15: Produits d'amplification spécifique de *F. culmorum*. M: marqueur de poids moléculaire 100 pb; Ligne 3-5-6: amplification chez 4 isolats de *F. culmorum*; T: témoins positif ; H2O: témoin négatif.

3.3. l'évaluation de la sensibilité variétale

Les symptômes sur les épis ont commencé à apparaître une semaine après l'inoculation, ces symptômes ont développé au cours du temps donc nous avons constaté que les variétés ont été sensibles à la *Fusarium culmorum*.

La figure n° : 16 est montre l'indice d'attaque des différentes variétés.



Source : (Original, 2017).

Figure n° 16 : Indice d'attaque pour les différentes variétés

Au cours de cet essai, la sensibilité de 9 variétés de blé à la fusariose de l'épi a été étudiée. L'inoculation artificielle des différentes variétés a été réalisée au moyen d'une suspension sporale d'une souche de *F. culmorum*. Une semaine après l'inoculation des épis, des symptômes de la fusariose sur épillets, ont commencé à apparaître sur les épis inoculés. A la fin de l'essai (18 jours après l'inoculation), les épillets inoculés n'ont pas été atteints de la même manière. Les épis.

Témoins, n'ont pas montré des symptômes d'attaques. Les résultats obtenus ont montré que pour les différentes variétés testées, les moyennes d'indices d'attaque sont presque similaires (Tableau 12), à l'exception des 2 ou 3 variétés (Mahon Demias, Mimouni, et Belikh 02) de blé nous avons noté un indice d'attaque légèrement plus élevée. Ce résultat suggère la présence d'effets légèrement plus élevés de la maladie sur cette variété de blé tendre.

❖ Discussion

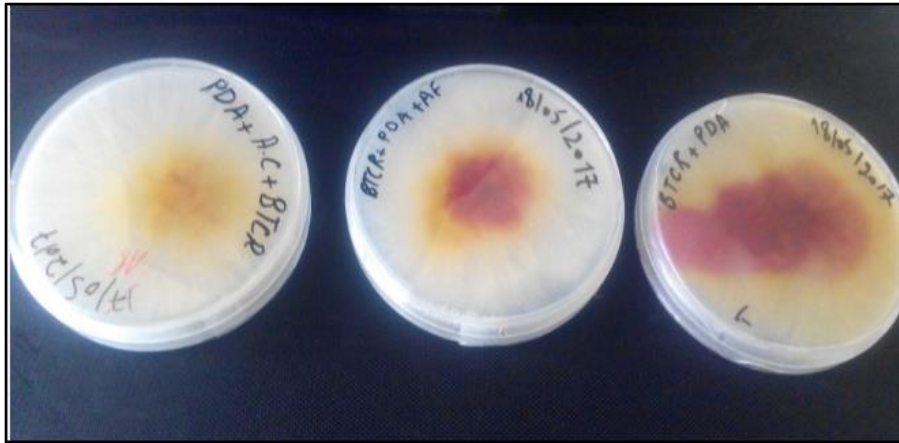
Le stade le plus sensible à la fusariose de l'épi est la floraison. En effet, l'infection des fleurs tend à se propager et à être retenue par les anthères avant de se propager dans les épillets (Parry *et al.*, 1995). De ce fait, ce test a été conduit au stade floraison, en plein champ. Les épis ont été inoculés par pulvérisation au moyen d'une suspension sporale. La même technique d'inoculation a été précédemment utilisée (Miedaner *et al.*, 1996

Buerstmayr *et al.*, 1999 ; Mesterházy *et al.*, 1999). Les résultats de cet essai ont indiqué que toutes les variétés testées ont montré des symptômes d'attaque de la fusariose de l'épi montrant leur sensibilité vis-à-vis à cette maladie. Au cours de ce test, le pourcentage des épillets infestés par épi ont été estimé en pourcentage. Les résultats ont indiqué que, pour la majorité des variétés testées, les niveaux d'infection sont presque égaux indiquant que ces variétés ont le même niveau d'attaque. Des études antérieures, ont montré que des estimations visuelles des symptômes de la fusariose de l'épi, sont suffisantes pour étudier la sensibilité variétale, sans avoir besoin d'identifier les dommages causées aux grains (Bakele *et al.*, 1994 ; Mesterházy, 1995). Jusqu'à maintenant aucune approche de sélection n'est capable de produire des cultivars et des germoplasmes hautement résistants à la fusariose de l'épi. Pour mieux cerner la base physiologique de la réaction de résistance, une variété ne doit pas seulement résister à l'infection au niveau de l'épi, mais aussi il faut mettre l'accent sur la relation existant entre les symptômes visibles sur l'épi et les autres conséquences de l'infection (l'accumulation de mycotoxines dans les grains, la réduction du poids de mille grains, et le taux de grains déformés) (Kleijer et Michel, 2001).

3.4. la Supplémentation des cultures par les acides phénoliques

3.4.1. Repiquage des souches dans le milieu PDA supplémenté par les acides phénoliques

La croissance mycélienne des isolats de *Fusarium culmorum* sur le milieu PDA en présence de l'acide caféique ou de l'acide férulique a permis d'observer des différences entre les boîtes où nous avons supplémenté les acides (les boîtes témoins contenant seulement l'isolat et le PDA). La figure n°17, Montre les résultats de croissance mycélienne :



Source : (Original, 2017).

Figure n° 17 : Croissance mycélienne de l'isolat *F.culmorum* sur milieu PDA en présence de l'acide caféique, acide férulique comparée à un témoin.

Ainsi, les mesures du diamètre des colonies ont été réalisées à partir du 5^{ème} jour, les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau n° 07 : Diamètre des colonies de différents isolats de *F. culmorum*

Isolat	Contenant de la boîte	Diamètre (cm) de la colonie	
		Après 5 jours	Après 10
BD11	Acide caféique	04cm	04cm
BD11	Acide férulique	03,5cm	04cm
BD11	témoin	04,5cm	Croissance totale
T706	Acide caféique	03,5cm	03,5cm
T706	Acide férulique	03cm	03,5cm
T706	témoin	05cm	Croissance totale

Source (Originale, 2017).

D'après les résultats du tableau ci-dessus, nous avons remarqué que les deux souches ont bien poussé dans les boîtes témoin ou le mycélium a envahi toute la boîte. Cependant la croissance mycélienne a été ralentie sur les milieux supplémentés en acides caféique et acide férulique.

3.4.2. Extraction des mycotoxines à partir de milieu MS supplémenté en les acides phénoliques

Les poudres d'acides phénoliques (acide caféique et acide férulique) ont été directement solubilisées dans le milieu MS (après autoclavage des milieux) Dans la partie

matériel et méthodes, les concentrations supplémentées de chaque acide phénolique ont été précisées.

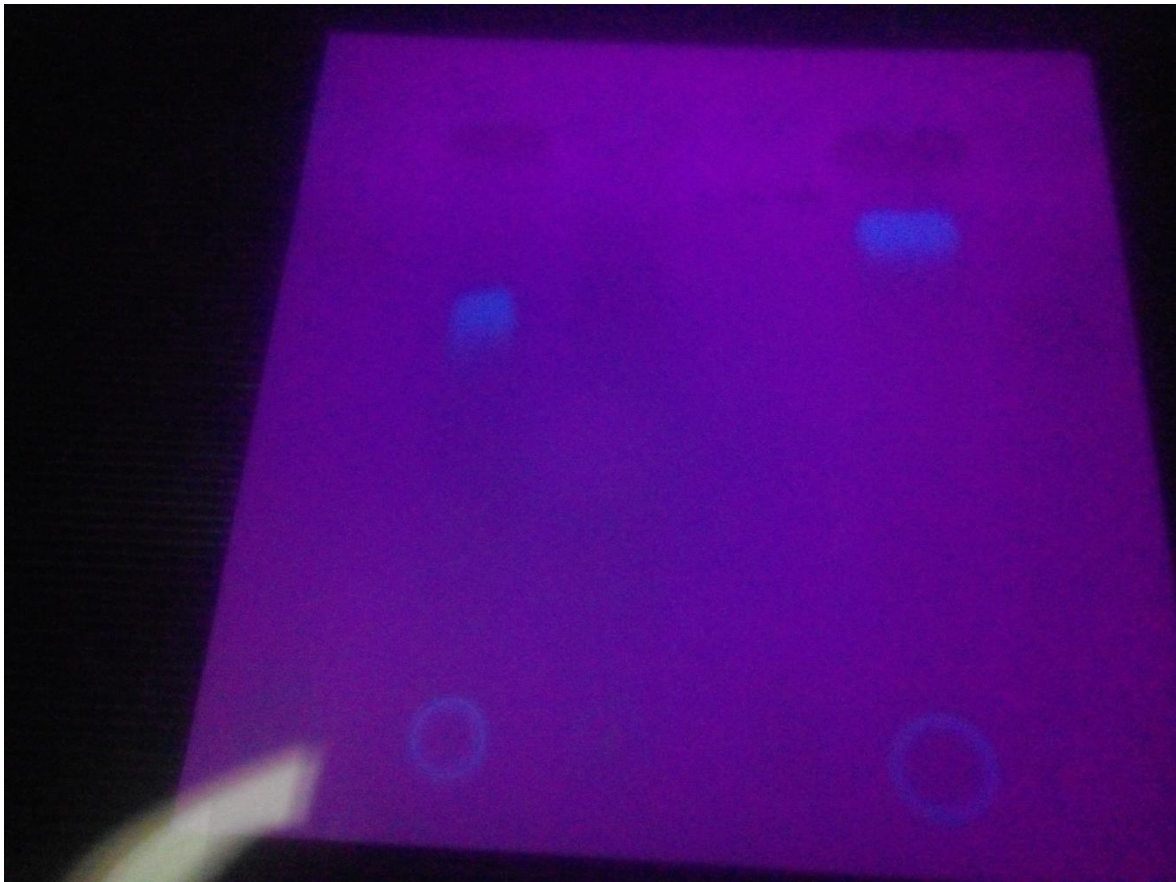
Après 15 jours d'incubation de milieu à 25°C, nous avons préparé nos extraits qui ont été soumis après à une séparation par chromatographie sur couche mince, la lecture à été réalisée sous la lampe UV (ultraviolet) de 366 nm et 254 nm.

L'effet de l'acide férulique et l'acide caféique a été étudié sur l'accumulation de trichothécènes par *Fusarium* cultivé sur un milieu liquide synthétique. En fonction de la concentration initiale et du temps de supplémentation, l'acide férulique réduit fortement la production de trichothécènes B par la souche de *F. culmorum*. Le pourcentage d'inhibition des niveaux de trichothécènes B semble augmenter en fonction de la concentration initiale en acide férulique et caféique supplémente aux cultures. L'addition de ces acides avant l'étape de germination des spores ou sur du mycélium a le même effet inhibiteurs final sur l'accumulation des TCT B. Deux supplémentations successives d'acide férulique conduisent à un effet inhibiteur cumulatif de la biosynthèse des TCT B. L'effet inhibiteur de l'acide férulique sur la biosynthèse des TCT B a été confirmé sur plusieurs souches de *Fusarium*, d'espèces et de chémotypes différents. De façon à analyser les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la biosynthèse des toxines par l'acide férulique,



Source (Originale, 2017).

Figure n° 18 : Résultat de la migration des mycotoxines à partir de milieu MS sans UV



Source (Originale, 2017).

Figure n° 19 : Résultat de la migration des mycotoxines de milieu MS sous UV 366 nm

❖ Discussion

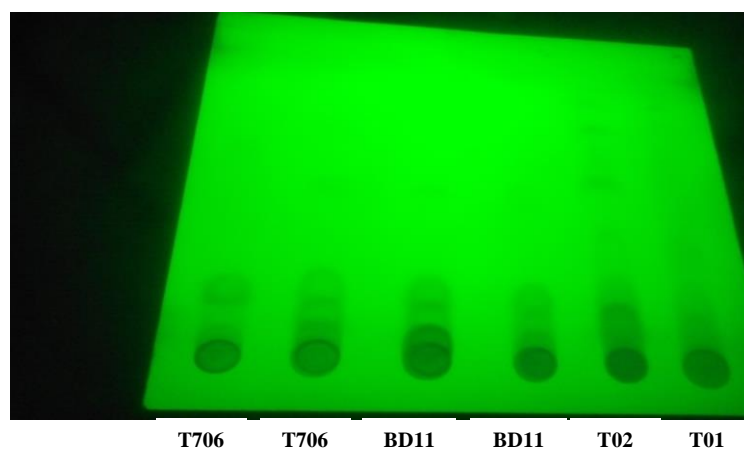
Acides cafeïque, férulique et seraient de potentiels éléments impliqués dans les mécanismes de résistance. Quand est-il de leur capacité à moduler la production de trichothécènes ? L'acide férulique inhibe la production des Trichothécènes par *F. culmorum* de 90% sans affecter la croissance (Beekrum *et al.*, 2003). Ceci suggère que les acides phénoliques pourraient avoir un rôle "anti mycotoxines", c'est-à-dire qu'ils seraient capables de limiter la biosynthèse des mycotoxines. L'effet de l'acide cafeïque a été étudié par (Montibus, 2013). son efficacité inhibitrice vis à-vis de la synthèse de déoxynivalénol s'est avérée similaire à celle de l'acide férulique. deux souches de *F. culmorum* de chémotype DON/ADON et NIV/FX ont été intégrées dans cette étude. Après 10 jours en cultures liquides dans du milieu MS, nous avons comparé la production de TCTB ainsi que la croissance fongique des souches entre cultures témoins et cultures supplémentées avec l'acide cafeïque et férulique. Les résultats de séparation sur CMC sont représentés sur les Figures n°19 et 20. Pour toutes les souches, la supplémentation en acide férulique et cafeïque n'a pas très affecté le développement mycélien. Concernant ces deux souches,

l'effet d'un ajout d'acide caféique et férulique dans le milieu a pas pu être mis en évidence. Les souches BD11 et T706, ont produit des TCT. Pour ces deux souches, la présence des acides férulique et caféiquea significativement affecté les teneurs en toxines accumulées sans trop impacter la croissance de mycélium. Un taux d'inhibition proche de 20 % a été mis en évidence pour les deux souches. Cette efficacité inhibitrice des souches considérées, est proche de celle déjà déterminée pour l'acide férulique (Boutigny, 2008).

3.4.3. Extraction des mycotoxines à partir de milieu solide supplémenté en les acides phénoliques

Les résultats obtenus après l'extraction des mycotoxines à partir le riz nous confirme que les acides phénoliques tels que l'acide férulique et l'acide caféique ont un effet efficace sur l'inhibition de la production des mycotoxine.

La migration par CCM montre qu'il n y a pas d'une migration des mycotoxines produites par notre souches.



T01 : Acide Caféique
T02 : Acide Férulique

Source : (Original, 2017).

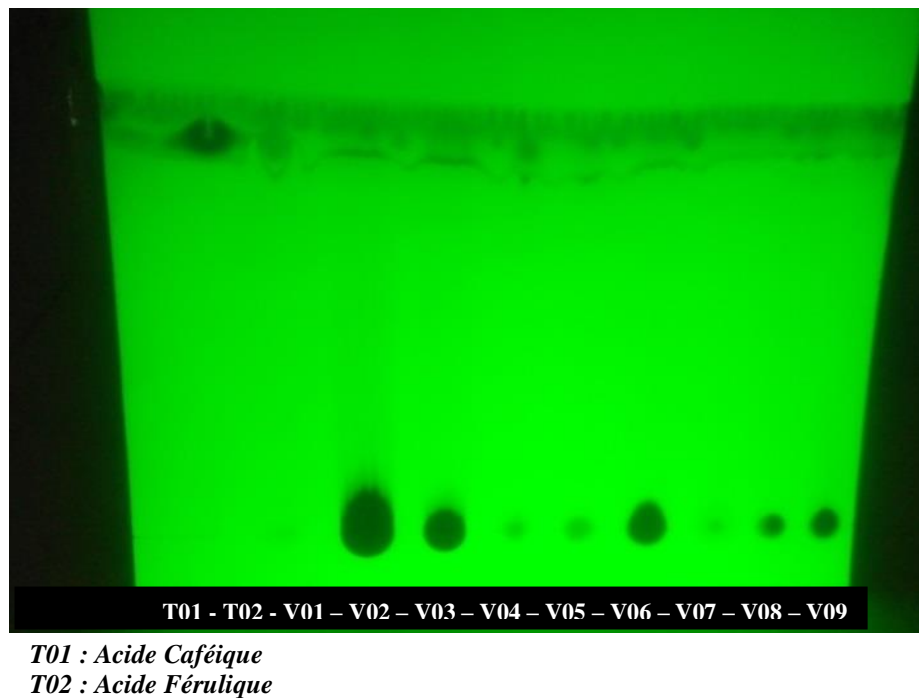
Figure n°20 : CCM 254 nm de la phase aqueuse de mycotoxine de milieu solide

3.5. Analyse des composés phénoliques des variétés de blé testés par CCM

L'analyse par CCM nous permet de détecté que malgré la variabilité de nos résultats, l'identification des composés phénoliques doit être renforcé par d'autre méthodes comme la chromatographie sur colonie et HPLC pour avoir plus de précision.

Malgré que la lampe UV 254 nm est faible, elle a permis d'observer de différentes migrations.les composés phénoliques sont hétérogènes d'une variété a une autre.

L'observation des différentes taches confirme que les épis de la variété 02,03 et 04 contiennent des acides phénoliques de type férulique et caféique au stade floraison. Ce qui coïncide avec les résultats de (Adom *et al.*, 2005).



Source : (Original, 2017).

Figure n°21 : CCM sous UV 254 nm de la phase aqueuse de neuf variétés de blé tendre et de blé dur au stade floraison dans le système (50/20/25 : H₂O distillé/n-butanol/EtOH).

Les résultats obtenus nous ont montré la richesse des céréales en composés phénoliques et l'existence d'une variabilité entre les variétés.

3.6. Discussion générale :

Des études précédentes, menées au laboratoire, ont démontré la présence de composés inhibiteurs de la biosynthèse des TCT B dans les sons de blé dur (Pinson-Gadai *et al.*, 2007). L'objectif de cette mémoire est de cibler des molécules présentes dans les sons de blé dur, pour leur effet modulateur *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*.

Les acides phénoliques, majoritairement concentrés dans les sons, pourraient constituer de bonnes molécules. En effet, plusieurs études antérieures ont suggéré *in vitro* un effet inhibiteur de ces composés sur la biosynthèse de diverses mycotoxines, incluant les aflatoxines (Hua *et al.*, 1999 ; Mahoney et Molyneux, 2004), les fumonisines (Beekrum *et al.*, 2003) et les trichothécènes B (Bakan *et al.*, 2003 ; Bily, 2003). Par ailleurs, il a été

montré que les compositions en acides phénoliques des grains varient selon les variétés de blé (Regnier et Macheix, 1996; Lempereur *et al.*, 1997; Lempereur *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2006; Mpofu *et al.*, 2006).

L'effet des acides phénoliques testés individuellement, et notamment de l'acide férulique qui constitue l'acide phénolique majoritaire des sons, sera étudié vis-à-vis de la biosynthèse des toxines.

Des variétés de blé tendre, présentant des niveaux différents de résistance à la fusariose, seront analysées pour leur composition en acides phénoliques au cours de la cinétique de remplissage des grains et en réponse à l'infection par *Fusarium*.

Conclusion

CONCLUSION :

Les céréales sont, sans doute, les matières premières les plus exposés à la contamination fongique. Le développement fongique sur ces substrats peut avoir plusieurs conséquences telles 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 étudié les composés phénoliques des variétés analysées.

L'identification morphologique a permis d'identifier deux espèces du *Fusarium* le *F. culmorum*, *F. pseudograminaurum* Et l'espèce de *Microdochium nival*.

Ces résultats a été confirmer par une analyse moléculaire par la PCR qui nous a permis d'identifier le *F. culmorum*.

Les résultats de la sensibilité variétale ont montré QUELes variétés de Gamgoum el rakhma, Djemila et Belikh 02 sont plus résistantes au *Fusariumcul* avec un taux de contamination respectivement 12%, 14%, 15%. Par contre la variété la plus sensible est Mahon Demias avec 31%.

La caractérisation biochimique des épis des neufs variétés par l'analyse CCM ont montré la présence de l'acide caféique chez les variétés Ardente, Djemila, Gamgoum el rakhma et Ofanto par l'acide caféique, et les variétés cham 3 et Djemila contiennentl'acide férulique.

Le teste in vitro sur l'inhibition de la production des mycotoxines de *Fusarium* supplémentées par des acides férulique et caféique , Montre que la production de trichothécènes B est totalement inhibée

Suite à ce travail, deux perspectives majeures de recherche se dégagent.

- identifiaion et caractérisation de la flore Fusarienne responsable de la fusariose à l'échelle national.
- Caractérisation biochimique quantitative des acides phénoliques chez le blé par HPLC.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- Abis S., 2012. Le blé en Méditerranée : sociétés, commerce et stratégies. Économie et territoire, relations commerciales. CIHEAM. Paris. Pp 241-247.
- Abramson D., Demianyk C. J., Fields P. G., Jayas D. S., Mills J. T., Muir W.E., Timlick B., White N. D.G., 2001. Protection des céréales, des oléagineux et des légumineuses à grains entreposés à la ferme contre les insectes, les acariens et les moisissures. Ed. Centre de recherche sur les céréales. 58 p.
- Arbault, P. et Daussant, J., 2005. Méthode d'analyses immunochimiques pour le contrôle de la qualité dans les IAA. *Tec. Et Doc.* Lavoisier 409 P.
- Balzer, A., Tardieu, D., Bailly, J.D., et Guerre, J. 2004. Les trichothécènes : nature des
- Battais F., Richard C. et Leduc V., 2007. Les allergènes du grain de blé. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 47, 171–174.
- Bell, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 21-81.
- Bennett J.W. & Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, pp 497-516.
- 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 ».
- Berhaut P., Le Bras A., Niquet G., Griaud P., 2003. Stockage et conservation des grains à la ferme, ARVALIS, Institut du végétale, Ed. Tec et Doc, Paris, 108 P.
- Beta, T., Nam, s., Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D., 2005. Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem.* 82 (4), Pp 390-393.
- Bonjean. et Picard. 1990. Les céréales a paille : origine, histoire, économie et sélection. Paris : Softword-Groupe ITM. 208p.
- Bottalico, A., and G. Perrone. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:611-624.
- 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, 2^{ème} édition, MASSON. ISBN :2-225-81987-4.

- Boufenar-Zaghouane, F. et Zaghouane, O. 2006. Guide des principales variétés de céréales à paille en Algérie (blé dur, blé tendre, orge, avoine). 1^{ère} édition. ITGC : Alger. 153 p.
- Boutigny, A-L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. Université Bordeaux. 202 p.
- Boutigny, a-l. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes b par *Fusarium*. Th. Doc. Université Bordeaux 1. 202 p.
- Brouillard, R., Figvire, P., El habiri, M., and Dangles, O. 1997. Molecular interaction of phenolic compounds in relation to the color of fruit and vegetables. In : les polyphénols en agroalimentaire. Sarni-Manchado, P; Cheynier, V. 2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.
- Cahagnier B., 1998- Céréales et produits dérivés. In : Bourgeois C. M., Mescle J.-F., Zucca J. (coord.). *Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Ed. Tec & Doc, Paris, pp. 392-414.
- Caron D., Dupont De Dinechin L. & Malavergne D. (2006) *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs et en fonction du travail du sol. In: CR 8^{ème} CIMA AFPP, Tours, France, pp. 293-303.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., & Penn P., 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, 157 pp.
- Champeil A., Dore T. & Fourbet J.F. (2004) *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166, 1389-1415.
- Champion R., 1997 - Identifier les champignons transmis par les semences. Ed. Editions Quae, France, 398 p.
- Davet, P. et F. Rouxel. 1997. « Détection et isolement des champignons du sol ». INRA édition. Paris. 201 p.
- Djermoun, A. 2009. La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Revue Nature et Technologie*. N °1, 45-53.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M. & Macdonald A.M.C. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 183-205.
- Eriksen G.S. 2003. Metabolism and toxicity of trichothecenes. In: *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, Sweden, 38 p.

- 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.
- Feillet P. 2000. Le grain de blé composition et utilisation. In: INRA EDITIONS, Paris, France, 308p.
- Frayssinet, C. and Fremy, J.M., 1991. Dosage des mycotoxines. Techniques d'analyse et contrôle dans les industries agro-alimentaire IV : analyses des constituants alimentaires. Lavoisier pp. 349-371
- Fredot E., 2012- Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. 3ème édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 613p.
- Friend J. 1981. Plant phenolics, lignification and plant disease. *Progress in Phytochemistry*, 7, 197-261.
- Gathumbi, J.K. Usleber, E., Ngatia, T.A., Kangethe, E.K., Martlbauer, E., 2003 Application of immunofinity chromathografy and enzyme immunoassay in rapid detection of aflatoxine B1 in chicken liver tissues. *Poultry science* 82(4) : 585-590.
- Gelinat P., 1995. Répertoire des micro-organismes pathogènes transmis par les aliments, Edisem, St Hyacinthe, Québec.
- Gilchrist, L. and Dubin, H.J. 2002. Fusarium head blight. In:Curtis, B.C., Rajaram, S., Go mez 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>.
- Gwimer J., Harnisach R., Mück O., 1996. Manuel sur la manutention et la conservation des graines après récolte, Ed. Eschborn, 368p.
- Henry Y., De Buyser J. 2000. L'origine des blés. Pour la Science, Hors-série n.26, p 60-62.
- Herbert, R.B. 1989. The Biosynthesis of secondary metabolites. 2ème edition Chapman andHalle p 2, 11-115.
- Hussein, HS. And Brasel, J.M., 2001. Toxicity métabolism and impact of mycotoxins on humans and animal. *Toxicology* 167 : 101-134
- IARC. 1983 .Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum, 31, 153-161.
- Kheladi M., 2009. L'industrie agroalimentaire : Réalité, Enjeux et problèmes. *Rechercheséconomiquesetmanagériales*. N° 6 : 32-67 pp.
- Leslie J.F. &Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. In: Blackwell publishing, 388 p.

- Macheix, J.J., Fleuriet, A et Christian, A .2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTURLausane.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A et Billot, J .1990. Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton. In : les polyphénols en agroalimentaire Sarni-Manchado P, CheynierV.2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.
- Mahoney, N.E. and Molyneux, R.J., 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of agricultural and food chemistry* 52(7) : 1882 p.
- Maury, S ; Legrand, M. 2000. Etude des O-méthyltransferases de la voie des phénylpropanoïdes dans le tabac et modulation de leur expression dans les tabac transgénique: conséquences sur la synthèse de la lignine et d'autre composés phénoliques et sur la résistance aux agents pathogènes : INIST-CNRS, cote INVIST: T 127548 Université de strasbourg, France.
- McMullen, M., Enz, P.J., Lukach, J., and Stover, R. 1997. Environmental 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.
- Mesterházy, Á. (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 675-684.
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Mirocha, C. G., & Komoróczy, R. (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, 118, 97-110.
- NdiayeD.S.B., 1999. Manuel de stockage et de conservation des céréales et des oléagineux, Coopérative Autrichienne pour le développement, 61p.
- Parry D.W., Jenkinson P. & McLeod L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Parry D.W., Jenkinson P. & McLeod L. 1995.*Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Pirgozliev S.R., Edwards S.G., Hare M.C. & Jenkinson P. 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731-742.

- Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M., 2005. Effects of trichothecenemycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 22, 369-378.
- Roudaut, H., Lefranq.E. 2005. Alimentation théorique, Série science des aliments, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitane. 305 p.
- Schilling, R., 2003. L'arachide situation et perspectives résumé de la conférence donnée à Agropolis Museum
- SFA. Société Française des Antioxydants .2005.Conte rendu de la conférence polyphenols (23/24 NOV2005). Institut des corps gras. ITERG
- Shewry P R., Underwood C., Wan Y., Lovergove A ., Bhandari D ., Toole G ., Clare Mills E.N ., Denyer K., Mitchell R. A.C. 2009- Storage product synthesis and accumulation in developing grains of wheat. *Journal of Cereal Science* Vol 50: 106-112.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., 1998-Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl.Microbiol.* 26: 118-122 pp.
- Sutton J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize. toxines présence dans les aliments et moyens de lutte. *Revue Méd. Vét.*155, 6, 299-314.
- Trucksesse, M.w., Young, K., 1990. Comparison of two immunochemical methods with thin-layer chromatographic methods for determination of aflatoxins. *J.Ass. off. Anal. Chem.* 3 : 425-428.
- Ueno Y. 1985. The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology*, 14, 99-132.
- Wang Y.Z. & Miller J.D. 1988. Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Phytopathology*, 122, 118-125.
- Xie, w., Mirocha, C.J. and Chen, J., 1997. Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B1 in corn by on line capillary liquid chromatography-fast atom bombardement mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 45(4) : 1251-1255

Site internet :

- http://www.agro.basf.fr/agroportal/fr/fr/cultures/les_cereales/la_protection_phyto_du_bl_e/les_maladies_ravageurs_et_adventices/les_maladies/Septoriose_Brulure_des_semis.html.

Annexes

Composition de milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA)

- Agar - agar 20g
- Pomme de terre 200g
- Dextrose (Glucose) 20g
- Eau distillée 100 ml

Composition de milieu de culture Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar

- Peptone bactériologique 15,0 g
- K_2HPO_4 1,0 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g
- chloramphénicol 0,2 g
- Crystal violet en solution aqueuse 1 ml
- Agar 15,0 g
- Eau distillée 1000 ml
- 0.2g de dichloron dans 100ml d'éthanol
- 50mg de Crystal violet dans 100ml d'eau distillée

Composition de milieu MSM (Mycotoxin Synthetic Medium)

- KH_2PO_4 0.6g/L
- K_2HPO_4 0.017g/L
- $(NH_4)_2SO_4$ 1g/L
- Biotine 0.1mg/L
- Glucose 20g/L
- Solution de sels minéraux 50X 0.1ml/L
- Eau distillée 1000 ml

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