



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 : DEBBA Kheira

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : PROTECTION DES VEGETAUX ET DE L'ENVIRONNEMENT

Thème

**Etude in vitro de l'effet des extraits d'acide phénolique
issus des variétés de blé, sur la biosynthèse des
trichotécènes de type B**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
M Gouzi Hicham	MCA	Président
Melle Zaza Massouda	MAA	Examineur
Mme Touati Sihem	MCB	Rapporteur

Promotion : 2017/2018

En premier lieu, Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de mémoire, Madame Touati-Hattab Sihem, Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Nos plus vifs remerciement à :

Au membre de jury d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail à savoir Mlle ZAZA MASOUDA et Monsieur GOUZI HICHAM.

Je voudrais exprimer ma gratitude au professeur Mr Saad Bakai pour sa patience, sa disponibilité et, surtout, ses conseils avisés, qui ont contribué à ma réflexion pendant mes études universitaires

J'aimerais aussi gratifier les efforts de Mr Yakoub Yahí qui a eu l'amabilité de répondre à mes questions et de fournir les explications nécessaires.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.

En fin et profondes reconnaissances à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail mais qui ne sont pas cités ici, nous les remercions tous chaleureusement.

Dédicace

Je dédier ce travail aux être qui sont plus chers de mon cœur, A ma chère Mère, qui n'a ménagé aucun effort pour m'encourager durant mes longues études. Qui a tout fait avec abnégation pour me voir réussir dans ce modes, et pour mon Père (que DIEU lui BENICE).

Je dédie le fruit de ce modeste travail à :

Instruit et m'avez tracé un chemin plein de lumière sans obstacles

C'est pour vous montrer ma gratitude et ma reconnaissance, pour ce que vous avez fait pour moi et pour ce que vous avez fait de moi tous Mes frères et mes sœurs.

A toute ma famille et à nos chers enfants, je t'aime.

A tous mes amis, ainsi tous mes camarades de section 2ème année Master protection des végétaux et environnement.

Sommaire

Introduction.....	1
1. Analyse bibliographique.....	4
1.1.Le blé.....	4
1.1.1.Importance économique.....	4
1.1.2.Caractéristiques morphologiques et physiologiques.....	6
1.1.3.Le grain du blé.....	6
1.1.3.1. Composition du grain.....	7
1.1.4. Pathologie de la plante.....	9
1.2.La fusariose du blé.....	9
1.2.1.L'importance économique.....	10
1.2.2. Le pathogène principal responsable de la fusariose: Fusarium.....	12
1.2.3.Le cycle de la maladie.....	12
1.2.4. Conditions favorables au développement de la maladie.....	14
1.2.4.1.Conditions climatique.....	14
1.2.4.2. Condition agronomique	14
1.2.4.3. Condition physiologique	
1.3.Les mycotoxines.....	15
1. 3.1. Les trichothécènes.....	15
1.3.2.Toxicité.....	18
1.4.Composés phénoliques.....	18
1.4.1.Quelques axes actuels des recherches concernant les composés phénoliques.....	19
1.4.2.Les composés phénoliques : des molécules intéressantes dans les mécanismes de résistance chez le blé.....	20
1.4.3.Molécules antifongiques et « anti-mycotoxines ».....	22

2. Matériel et méthodes	23
2.1. Extraits des acides phénoliques naturels et algue testés.....	24
2.2. Souches de <i>Fusarium</i>	25
2.3. Effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne.....	25
2.3.1. Effet de l'acide férulique et de l'acide caféique.....	25
2.3.2. Effet des acides phénoliques naturels sur la croissance mycélienne.....	25
2.4. Effet des trois souches de <i>Fusarium</i> sur la croissance de la coléoptile in vitro.....	26
2.5. Etude de l'effet d'acides phénoliques sur la biosynthèse des TCTB chez <i>F. culmorum</i> et <i>F. graminearum</i>	27
2.5.1. Culture des spores dans le milieu MS.....	27
2.5.2. Supplémentation des cultures par les acides phénoliques.....	28
2.5.2.1. Acides phénoliques individuels.....	28
2.5.3. Extraction des mycotoxines sur un milieu liquide.....	28
2.5.4. Méthode physique de séparation et d'analyse de TCTB	29
2.5.4.1. Chromatographique sur couche mince.....	29
2.5.4.2. Développement des chromatogrammes.....	30
2.5.4.3. Analyse des TCTB par spectrophotomètre.....	32
3. Résultat et discussion	33
3.1 Effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne.....	34
3.1.1 Effet de l'acide férulique et l'acide caféique.....	34
3.1.2 Effet des extraits organiques sur la croissance mycélienne.....	37
3.2 Effet de <i>Fusarium</i> spp. supplémentés par l'acide férulique et caféique sur la croissance de la coléoptile in vitro.....	37
3.3 Etude de l'effet d'acides phénoliques et extrait d'algue sur la biosynthèse des TCTB chez <i>F. culmorum</i> et <i>F. graminearum</i>	39
3.4 Résultat d'analyse des TCTB par spectrophotomètre.....	40

3.5 Discussion.....	43
Conclusion.....	44
Référence.....	47
Résume	

Liste de figure

Figure 01: Structure d'un grain de blé.....	8
Figure 02: Constitution histologique d'un grain de céréale.....	8
Figure 03: Symptômes de la fusariose de l'épi du blé; les épis montrent plus ou moins d'épillets affectés.....	11
Figure 04: Grains de blé fusariés.....	11
Figure 05: Cycle de vie des espèces du genre <i>Fusarium</i> et <i>Microdochium</i> responsables de la fusariose.....	13
Figure 06: Structure générale des trichothécènes.....	16
Figure 07: Structure des régions génomiques contenant les gènes <i>Tri</i> connus.....	17
Figure 08: Les acides phénoliques dans la paroi cellulaire.....	21
Figure 09: boîtes de Pétri contenant les graines de blé inoculées par le mycélium	27
Figure 10: Conditions de culture	28
Figure 11: Séparation de deux phases, la phase organique et le milieu MS.....	30
Figure 12: Préparation de CCM.....	32
Figure 13: Effet de l'acide férulique à différentes concentrations sur la croissance de <i>Fusarium culmorum</i> pour différents temps de culture.....	38
Figure 14: Effet de l'acide cafeique à différentes concentrations sur la croissance de <i>Fusarium culmorum</i> pour différents temps de culture.....	39
Figure 15: grains germés avec des acides ajoutés dans le milieu de culture.....	41
Figure 16: Illustration des développements morphologiques différents du mycélium en fonction des acides phénoliques et extrait d'algue supplémentés.....	42
Figure 17: Révélation de la plaque CCM sous les rayons UV 254.....	43
Figure 18: Effet des AC, AF et ALG sur la biosynthèse des TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> cultivée sur milieu MS.....	45

Liste des abréviations

AC : Acide Caféique

AF : Acide Férulique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

CCM : Chromatographie sur couche mince

DON: Déoxynivalenol

FAO: Food and Agriculture Organization

FHB: Fusarium Head Blight

LNPV : Laboratoire National de Protection des Végétaux (France)

MS : Mycotoxine Synthetic medium

NIV : Nivalenol

PDA: Potato Dextrose Agar

Rpm: Rend par minute

TCT : Trichothécène

TCTB : Trichothécènes de type B

UV : Ultra-violet

Liste de tableau

Tableau1 :	Les superficies, la production et le rendement du blé dur et du blé tendre en Algérie dans les années 2009 et 2010.....	6
Tableau2 :	Composition des différentes parties du grain.....	7
Tableau3 :	Les extraits d'acides phénoliques naturels testés sur la croissance fongique.....	25
Tableau4 :	Liste des différentes souches de <i>Fusarium</i> utilisées.....	26
Tableau5 :	Effet des deux acides phénoliques férulique et caféique sur les <i>Fusarium</i> dans la réduction de la croissance de la coléoptile des grains de blé.....	41
Tableau 6:	Répartition des isolats en groupes homogènes selon l'analyse CMM de biomolécule.....	45

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, la céréaliculture revêt une importance majeure dans l'économie nationale par l'importance des superficies occupées et par son poids dans la réalisation de la sécurité alimentaire Zaghouane et al. (2006). Par ailleurs, les blés (dur et tendre) représentent la consommation alimentaire de base dans le pays. La consommation moyenne annuelle est estimée à 207 kg/habitant, derrière le Maroc (210 kg) et la Tunisie (232 kg) (Hamadache, 2013). En dépit de l'importance socioéconomique des blés, l'Algérie n'a cessé d'enregistrer un déficit céréalier systématique qui est comblé chaque année par des importations (Rastoin et Benabderrazik, 2014). Bien que différentes mesures aient été prises pour améliorer la production nationale des blés et assurer notre sécurité alimentaire en cette denrée de base, la qualité des grains récoltés continue à être appréciée sur la base du poids spécifique, de l'humidité, des taux de métadinage et des impuretés (Zaghouane et al., 2013). Or, la qualité sanitaire des grains récoltés dépend étroitement de la présence de moisissures et de leurs mycotoxines (Cahagnier, 1998). Ces contaminants biologiques constituent actuellement un problème majeur de sécurité sanitaire des aliments. Parmi les problèmes phytosanitaires affectant la qualité des grains de blé, la fusariose de l'épi ou *Fusarium Head Blight* (FHB) est connue comme l'une des maladies les plus destructrices dans les principales zones de production du blé à savoir l'Europe et l'Amérique du Nord (Bottalico et Perrone, 2002).

L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables et à l'altération de la qualité des grains par les mycotoxines (Lori et al., 2009). Parmi les fusariotoxines présentes sur blé, les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines sont les plus rencontrées. Nous nous intéressons dans ce travail particulièrement aux trichothécènes de type B ou TCTB dont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées (3 ADON) et (15 ADON), le nivalénol (NIV) et sa forme acétylée, la fusarénone X (FX) (Balzer et al., 2004, Bennett et Klich, 2003, Sweeney et Dobson, 1999).

L'espèce *F.culmorum*, majoritairement présente dans le blé en Algérie, produit des mycotoxines appelées trichothécènes de type B (Touati-Hattab et al., 2016 ; Laraba et al., 2017).

A l'heure actuelle, en cas de conditions climatiques favorables à contamination par *Fusarium* et au développement de la maladie, il n'existe pas de stratégie suffisamment efficace

permettant de garantir des niveaux de trichothécènes acceptables dans les récoltes. Les fongicides de synthèse utilisées pour combattre *Fusarium* et limiter la contamination en mycotoxines ne sont pas suffisamment spécifiques et sont susceptibles d'induire un déséquilibre de la population fongiques en faveur, des espèces toxigènes les plus productrices en toxines. Par ailleurs, le risque sanitaire lié à l'utilisation excessive de ces fongicides n'est pas négligeable (Soro S . ,2010).

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).

Les biofongicides regroupent l'ensemble des molécules naturelles ayant une efficacité vis-à-vis des champignons. Vis-à-vis de *Fusarium*, il serait intéressant d'employer des molécules à effet antifongique avéré mais aussi capable de cibler spécifiquement les voies de toxinogénèse.

Certains composés phénoliques pourraient remplir ces critères.

Dans ce contexte, la question scientifique :

Dans les grains, plusieurs acides phénoliques sont présents simultanément à des concentrations différentes. Dans ces conditions, quel est leur effet sur la croissance fongique et la biosynthèse des toxines par *Fusarium* ?

Des extraits naturels et acide phénoliques reconstitués ont été testés *in vitro* à différentes concentrations vis-à-vis de la croissance mycélienne et mycotoxinogénèse de deux souches de *F. culmorum* de chémotypes différents et une souche de *F.graminearum*.

L'étude *in vitro* de tels composés pourrait permettre de sélectionner des variétés pour leur composition plus ou moins riches en composés modulateurs de la mycotoxinogénèse.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE



1.1.Le blé

Le blé (genre *Triticum*, famille des Poacées) est une céréale originaire du croissant fertile. Cette ressource a d'abord été utilisée par l'homme, il y a plus de 10000 ans, grâce à la cueillette dans les espaces sauvages. Entre -8900 et -7500, la culture du blé a été instituée passant d'un usage sauvage de la plante à un usage domestique. Cette culture s'est étendue à l'Asie centrale, à l'Europe du sud et à l'Égypte entre -7500 et -6200 (Feldman et Millet, 2001).

Le blé est aujourd'hui une céréale primordiale à travers le monde, aussi bien sur le plan économique que sur celui de l'alimentation. On parle souvent du blé tendre (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) et du blé dur (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* Desf. Husn.) qui sont les deux espèces les plus communément cultivées du fait de leur exigences pédoclimatiques et de leur qualités biochimiques et techniques répondant à des besoins alimentaires complémentaires.

Le blé dur se distingue du blé tendre par son grain à albumen vitreux avec une amande dure et sa plus forte teneur en protéines. Le blé dur est tétraploïde avec un équipement chromosomique $4n=28$ chromosomes alors que le blé tendre est hexaploïde, avec $6n=42$ chromosomes (Feillet, 2000).

1.1.1. Importance économique

Le blé est la deuxième plante cultivée au monde en termes de quantités (653 millions de tonnes en 2010), derrière le maïs (826 millions de tonnes), et la première en termes d'échanges commerciaux (125 millions de tonnes échangées en 2010 (FAO, 2011)).

La production mondiale de blé a presque triplé en l'espace de 44 ans, passant ainsi de 222 millions de tonnes en 1961 à plus de 626 millions de tonnes en 2005. Au 6 octobre 2016, les prévisions de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) établissaient la production mondiale de blé en 2016-2017 à 742 millions de tonnes et sa consommation estimée à 730,5 millions de tonnes. ([source:https://www.planetoscope.com/cereales/191-production-mondiale-de-ble.html](https://www.planetoscope.com/cereales/191-production-mondiale-de-ble.html)). Si l'on se réfère aux études et aux projections publiées par la FAO qui prennent en compte le développement démographique mondial, les besoins devraient

encore s'accroître dans les années à venir, pour atteindre sans doute 1000 millions de tonnes de blé en 2020 (source :<http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/plan.htm>).

En Algérie, la céréaliculture a 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).

Le blé est cultivé à travers l'ensemble des zones agro-écologiques, mais il est essentiellement localisés dans les régions semi-arides et même arides et donc, soumis aux aléas climatiques qui pénalisent fortement les niveaux de productivité et par la même occasion la production (Boulal et *al.*, 2007).

La superficie occupée par le blé dur en 2010 avoisine 1,1 millions d'hectare et le rendement moyen est de 15,3qx/ha, tandis que le blé tendre occupe une superficie réduite qui avoisine 0,5 million d'hectare et le rendement moyen est de 13,9qx/a (MADR, 2010). (Tableau 1).

La production des 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 significativement : 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).

Tableau 1: Les superficies, la production et le rendement du blé dur et du blé tendre en Algérie dans les années 2009 et 2010

Année	Culture	Superficie (ha)	Production (qx)	Rendement (qx/ha)
2009	Blé dur	1262842	20010378	15,8
	Blé tendre	585733	9520791	16,3
2010	Blé dur	1181774	18089739	15,3
	Blé tendre	573954	7962041	13,9
Taux d'accroissement 2009/2010	Blé dur	-6	-10	-3
	Blé tendre	-2	-16	-15

(MADR ,2010).

1.1.2. Caractéristiques morphologiques

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*) (Soltner, 1990).

Le blé dispose, au cours de son développement, de deux systèmes racinaires successifs (Belaid 1996). Le système racinaire primaire, est constitué d'une racine principale et Le système racinaire secondaire ou tallage (ou système coronaire) La tige creuse ou chaume constitue le système aérien, dont les entre-nœuds ne se sont allongés qu'à la montaison, porte des feuilles engainantes à nervures parallèles (Belaid, 1996 ; Soltner, 2005).

1.1.3. Le grain du blé

Le grain de blé est un caryopse nu constitué d'un albumen représentant 80 à 85% du grain, d'enveloppes de la graine et du fruit (13 à 17% du grain) tandis que le germe n'est composé que de 3%.(Soltner, 2005).

1.1.3.1. 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 (tableau). (Roudant et *al*, 2005)

Le grain est principalement constitué d'amidon (environ 70%), de protéines (10 à 15%) et de pentosanes (8 à 10%) et contient aussi en faibles quantités des lipides, de la cellulose, des sucres libres, des minéraux et des vitamines (Feillet, 2000). Les sons de blé sont constitués principalement de polysaccharides, incluant des arabinoxylanes, des xyloglucanes et de la cellulose, mais contiennent aussi des quantités significatives d'acides phénoliques, de lignine et de protéines (Parker *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Composition des différentes parties du grain (Roudant et *al*, 2005)

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

ENVELOPPES (SON)

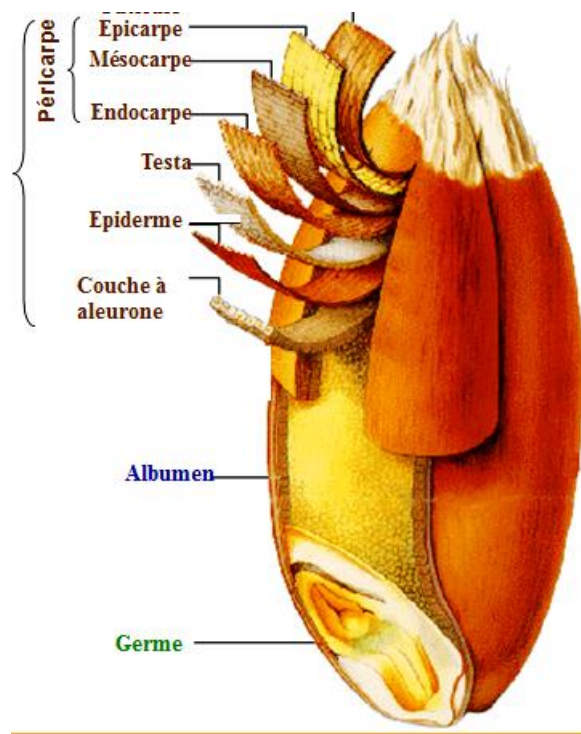


Figure 1: Structure d'un grain de blé DEWALQUE Marc.
(Janvier 2012).

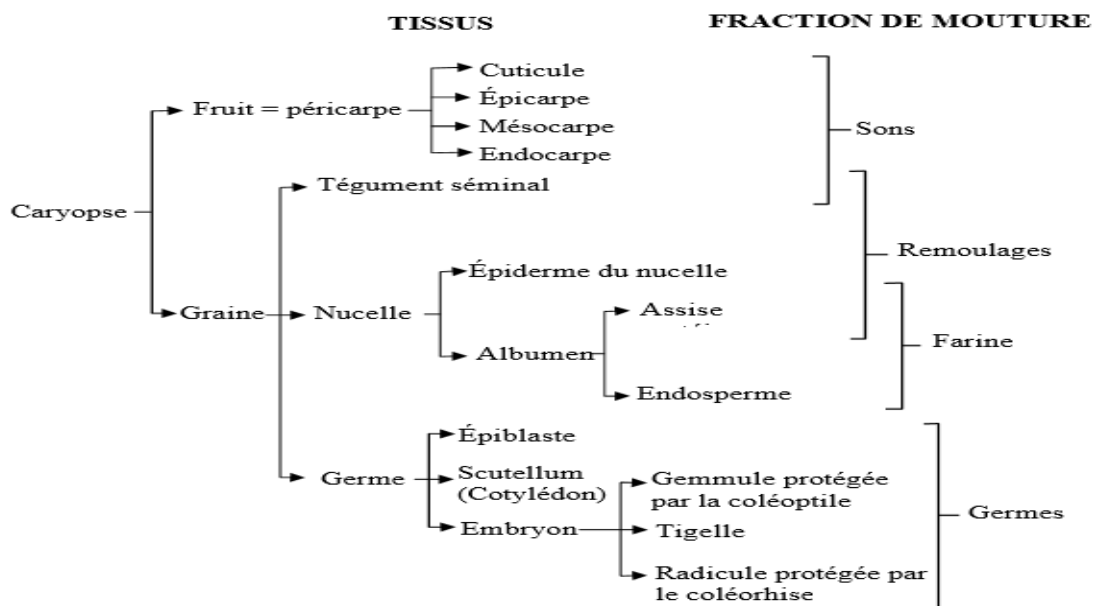


Figure 02: Constitution histologique d'un grain de céréale (Godon et willm, 1991).

1.1.4. 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). Selon Feliachi (2002) une estimation sur les pertes causées par les ennemis du blé que soit lors de la récolte ou lors du stockage est voisine de 30%. Cette dépréciation est le résultat de l'existence de plusieurs agent tels que les champignons, les virus, les bactéries, les nématodes et les adventices.

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.

1.2. La fusariose du blé

La fusariose est une maladie fongique qu'on trouve sur toute une gamme d'hôtes, dont le blé, l'orge, l'avoine, le maïs, le seigle et les herbages graminées (Richard, 2004 ; Wegulo *et al.*, 2008 et Mathieu *et al.*, 2012). La fusariose est causée par le genre *Fusarium* et *Microdochium* où les symptômes sont décelables peu après la floraison (Simpson *et al.*, 2001). Les principales espèces communes responsables des fusarioses sur blé sont : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, et *Microdochium nivale* (anciennement nommée *Fusarium nivale*) (Parry *et al.*, 1995 ; Miedaner, 1997 ; Tekauz *et al.*, 2000 ; Brennan *et al.*, 2003).

Dans des conditions climatiques favorables, la fusariose peut attaquer tous les organes du blé et à tous les stades de développement, depuis les racines jusqu'aux épis, engendrant trois types de maladies (Parry *et al.*, 1995):

- _ La fonte de semis (seedling blight)
- _ Le piétin fusarien (foot rot, crown rot)
- _ L'échaudage des épis ou la fusariose de l'épi (Fusarium Head Blight)

Nos travaux sont centrés sur la fusariose de l'épi. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1884 en Angleterre sous le terme « *Fusarium Head Blight* » ou

« FHB », et a pris une ampleur considérable ces dernières années en Asie, au Canada, en Europe ou encore en Amérique du Sud (Goswami et Kistler, 2004). La maladie a été identifiée comme un facteur majeur limitant la production du blé dans plusieurs parties du monde (Stack, 2000).

La fusariose des épis de blé est caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée, les épis apparaissent alors blanchâtres (Mascheret *al.*, 2005), 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 (Champeil et *al.*, 2004 ; McMullen et *al.*, 2008).

1.2.1.L'importance économique :

La fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables et à l'altération de la qualité des grains (Pirgozliev et al., 2003). Après inoculation d'épis de blé par *F. culmorum*, Häni (1981) a observé des pertes de rendement de 60%. Au cours d'études menées en champs avec du blé infecté artificiellement, Arseniuk et *al.*, (1993) ont observé que le poids de 1000 grains, le nombre de grains par épi et le poids moyen des épis étaient réduits de 15%, 18% et 22% respectivement.

La fusariose affecte également les qualités nutritives et technologiques des grains, ce qui a des conséquences néfastes lors des processus de transformations industrielles des grains. Il a été mis en évidence que l'invasion du grain de blé par *F. graminearum* entraînait la dégradation des grains d'amidon, des protéines de réserve et des parois cellulaires (Bechtel et al., 1985).

Dexter et al. (1997) ont observé que les farines issues d'échantillons de blé contenant des grains contaminés par *Fusarium* présentaient des qualités de panification (cuisson) non satisfaisantes. La fusariose peut également diminuer la qualité des futures semences. En effet, semer des graines de céréales infectées par *Fusarium* peut entraîner des symptômes de fontes de semis et des symptômes de fusariose de la tige chez les plantules (Pirgozliev et al., 2003).



Figure 3: Symptômes de la fusariose de l'épi du blé; les épis montrent plus ou moins d'épillets affectés (Quenneville et Lauzo 2017)

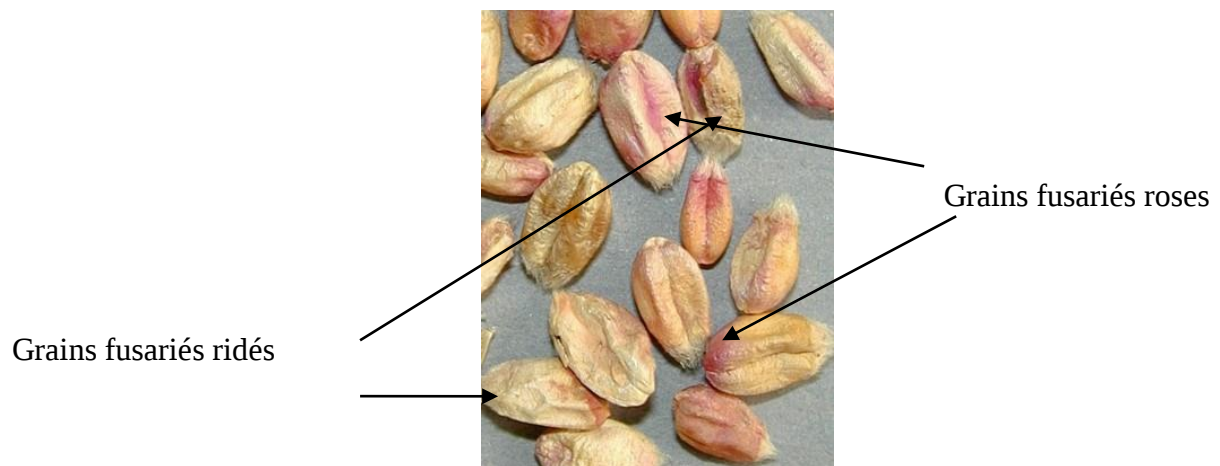


Figure 4 : Grains de blé fusariés

(Boutigny 2007)

1.2.2. Le pathogène principal responsable de la fusariose : *Fusarium*

La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* et une espèce du genre *Microdochium* (Arseniuk *et al.*, 1999).

Les *Fusarium* sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Ce genre fongique comprend plus de 100 espèces, dont plusieurs sont phytopathogènes. Les plus fréquemment retrouvées sur blé sont *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* qui produisent des trichothécènes B et de la zéaralénone. (Bennett et Klich 2003 ; Kristensen *et al.*, 2005 ; Champeil *et al.*, 2004). Au sein des espèces *F. graminearum* et *F. culmorum*, les souches ont des capacités très différentes à produire des trichothécènes B.

L'analyse de la bibliographie de ces dernières années permet la représentation schématique de la flore fusarienne sur blé en Europe décrite sur la figure 8 (Bottalico et Perrone, 2002 ; Waalwijk *et al.*, 2003 ; Ioos *et al.*, 2004 ; Roháček et Hudec, 2005 ; Schollenberger *et al.*, 2007). Les espèces *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* sont prédominantes. Puis, les espèces *F. culmorum*, *F. tricinctum* et *F. sambucinum* sont également importantes.

Les résultats de l'enquête réalisée en Algérie durant les années 2012-2013 et 2014 ont montré que *F. culmorum* est l'espèce prédominante observée en Algérie sur le blé, suivi par le *Microdochium nivale* et *Fusarium pseudograminearum* qui a été observé également assez fréquemment. Des espèces plus minoritaires comme *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* et *F. avenaceum* sont également recensées (Touati-Hattab, 2018)

1.2.3. Le cycle de la maladie

L'infection d'une plante par *Fusarium* peut avoir plusieurs origines : une origine biotique dans le cas d'un oiseau ou d'un insecte qui transporterait des spores et les dissémineraient dans la nature ; ou une origine abiotique lorsque c'est le vent ou la pluie qui permet la dissémination des spores dans la nature (Mongrain *et al.*, 2000).

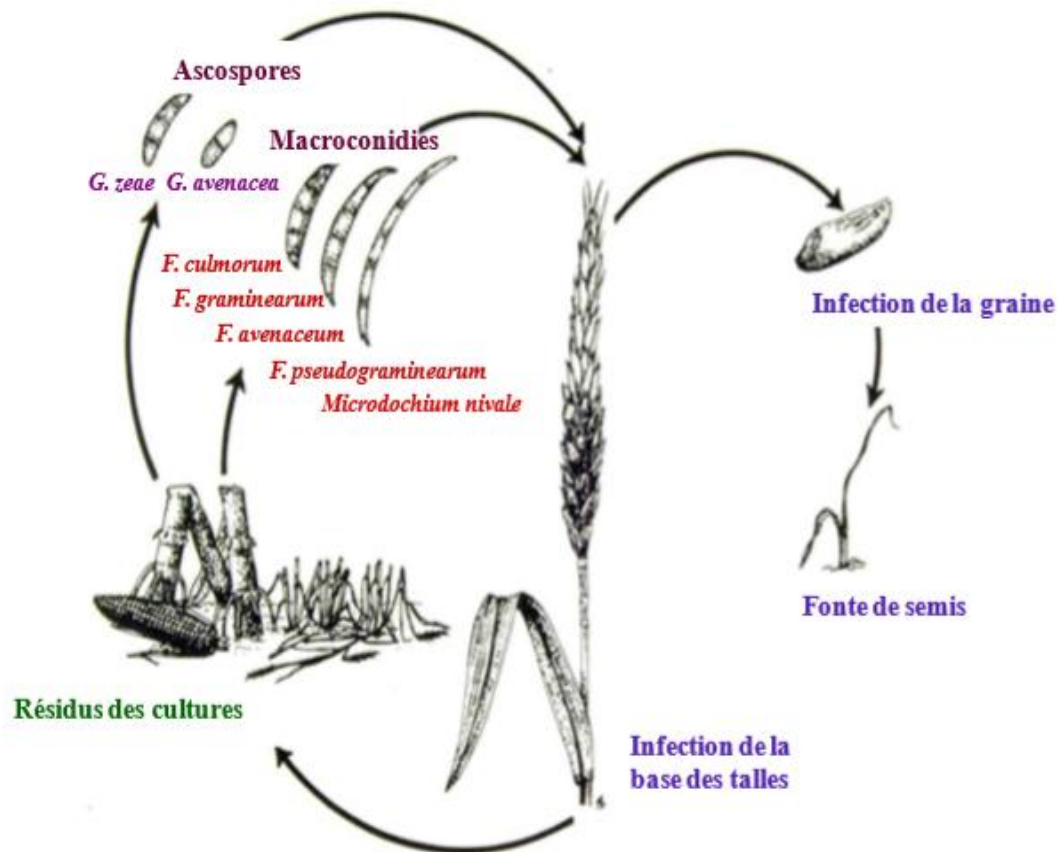


Figure 5 : Cycle de vie des espèces du genre *Fusarium* et *Microdochium* responsables de la fusariose (Parry *et al.*, 1994).

L'inoculum primaire est la source principale d'inoculum pour l'apparition de la maladie (Trail, 2009). Cet inoculum primaire se trouve sur les résidus de culture antérieure infectés qui permettent, après la récolte, le développement de périthèces et donc d'ascospores.

Le champignon est alors sous sa forme sexuée, *Gibberella*. Par la suite, les ascospores vont germer si l'humidité relative (HR) est supérieure à 85% et la température avoisine les 25-30°C.

L'infection peut intervenir à différents stades de développement de la plante-hôte puisque la pénétration du champignon se fait par les zones dites sensibles, c'est-à-dire des ouvertures de tissus dues à la sénescence, par les anthères après la floraison, ou encore par le péricarpe (Kang et Buchenauer, 2002).

1.2.4. Conditions favorables au développement de la maladie :

La sévérité de la fusariose est conditionnée par trois facteurs indépendants des champignons (Bai et Shaner, 1994 in Siou, 2014) :

1.2.4.1. Les facteurs climatiques

La température et l'humidité sont responsables de 48 % de la variation dans la maladie. Le climat joue donc le rôle principal dans le développement de la maladie. (Mathieu *et al.*, 2012).

1.2.4.2. Les facteurs agronomiques

Ils jouent un rôle principalement dans la conservation de l'inoculum primaire. Ainsi, un précédent cultural sensible à la fusariose (maïs, blé, orge), infecté lors de son cycle, est une source potentielle d'inoculum pour la culture suivante via ses résidus. Egalement, le travail du sol augmenterait la dégradation des résidus en favorisant l'activité microbienne et donc limiterait la colonisation des résidus par *F. graminearum* (Pereyra *et al.*, 2004) .

1.2.4.3. Les facteurs physiologiques

La maladie dépend de la quantité d'inoculum présent dans le précédent cultural, qui détermine en partie l'inoculum présent, et dépend aussi de la sensibilité des plantes, de l'état de stress, le stade de développement, la date et la durée de la floraison et le niveau de résistance de la variété (Champeil *et al.*, 2004).

1.3. Les mycotoxines

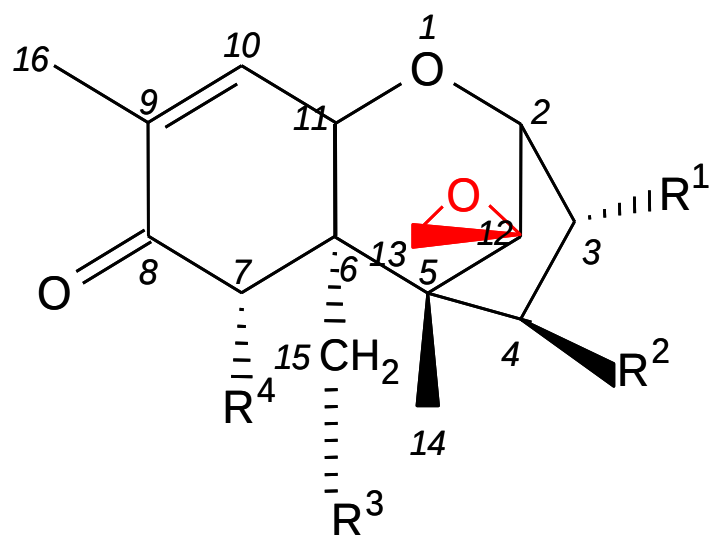
Les mycotoxines sont des molécules aux structures chimiques très variées. Ce sont des métabolites secondaires synthétisés par des champignons filamenteux parmi lesquels les genres principaux sont *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps* (Steyn, 1995). Les espèces de *Fusarium* produisent différents types de mycotoxines parmi lesquelles les plus fréquentes sont les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone (Placinta et al., 1999). Ces mycotoxines sont connues pour être produites au champ, mais également lors du stockage du grain si de l'eau est disponible (Langseth et al., 1997).

1.3.1. Les trichothécènes

Les trichothécènes sont produits au champ principalement par des *Fusarium*. Ils peuvent aussi être produits par d'autres genres de micromycètes tels que *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*... (J. W. Bennett et M. Klich, 2003).

Les trichothécènes (TCT) sont des sesquiterpènes avec un noyau tricyclique substitué par un groupement époxyde en C12 et C13 responsable de leur toxicité (Rocha et al. 2005). Ils sont répartis en 4 types de A à D en fonction des substituants. Les deux types de TCT les plus fréquemment retrouvés sur les céréales sont avant tout les TCT B puis les TCT A.

Parmi les TCT B on retrouve quatre groupes qui diffèrent par leurs chaînes latérales il y a le déoxynivalénol (DON) et ses dérivés acétylés le 3- et 15-déoxynivalénol (3-ADON et 15-ADON), le nivalénol (NIV) et sa forme acétylée fusarénone X (FX) (Bennett et al., 2003) (Figure 6).



Trichothécènes B	R1	R2	R3	R4
Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH
3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON)	O-CO-CH3	H	OH	OH
15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON)	OH	H	O-CO-CH3	OH
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH
Fusarenone X (FX)	OH	O-CO-CH3	OH	OH

Figure 6: Structure chimique de cinq trichothécènes de type B. Source : (Ponts, 2005)

Plusieurs espèces peuvent produire des TCT B, mais en fonction de leur capacité à produire tel ou tel type de TCT B, les souches sont classées en trois chémotypes : le chémotype de type DON-3ADON, le chémotype DON-15ADON, et le chémotype NIV-FX (Ichinoe *et al.*, 1983).

Par conséquent, au sein d'une même espèce, il existe différents chémotypes et les différents génotypes ont potentiellement une capacité de production de toxine variable. (Luongo *et al* 2008) montrent que la toxicité du DON et de ses dérivés n'est pas équivalente et que certains dérivés peuvent être plus toxiques que le DON.

En Algérie, une étude récente a permis de conclure que les souches de *F. culmorum* sont majoritairement de chémotype DON/3 ADON avec un pourcentage de 95% par rapport au chémotype NIV/FX (5%) (Touati-Hattab, 2018).

Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B sont appelés « Tri ». Les chémotypes de TCT B résulteraient de différences structurales au niveau de certains gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes (Lee *et al.*, 2002)

Douze d'entre eux sont regroupés en le même locus fonctionnel « cluster *Tri* » et 3 se trouvent sur deux loci particuliers. Parmi ces gènes *Tri*, le gène *Tri5* joue un rôle important puisqu'il code pour la trichodiène synthase qui catalyse la formation du trichodiène, première étape de la voie de biosynthèse des TCTB.

Concernant les différences de chémotype, elles sont génétiques dépendantes. Les gènes *Tri7* et *Tri13* sont non fonctionnels chez les souches de chémotype DON/ADON. De plus, le gène *Tri3* code pour une 15-O-acétyltransférase nécessaire à la production de 15-ADON (Mc Cormick *et al.*, 2011).

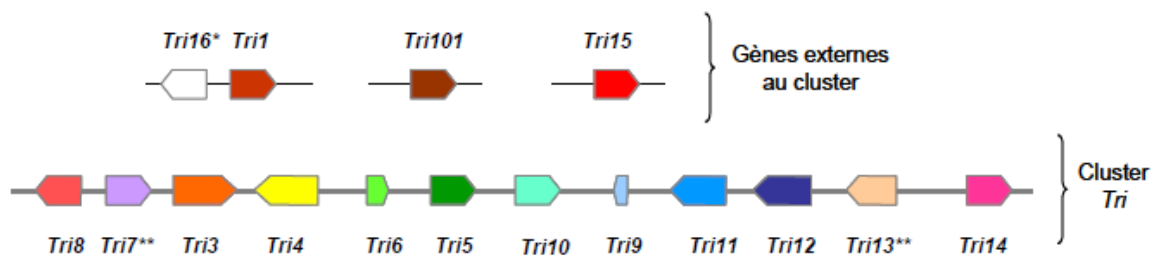


Figure 7 : Structure des régions génomiques contenant les gènes *Tri* connus

Source : Barreau C., communication personnelle; (Brown, McCormick et *al.* 2001; Kimura, Tokai et *al.*2003; McCormick, Harris et *al.* 2004)

Les flèches représentent le sens de traduction de chaque gène. * = gène non fonctionnel chez *F. graminearum* ; ** = gènes non fonctionnel chez *F. graminearum* de chémotype DON exclusivement.

1.3.2. Toxicité

Les trichothécènes sont thermostables et résistantes aux différents procédés industriels de transformation des grains. Il est donc impossible de les éliminer par des traitements simples utilisés dans l'agroalimentaire (D'Mello, *et al.*, 1999; Hazel et Patel, 2004). Il est à noter que jusqu'à 40% de la teneur en TCT B du grain récolté peut se retrouver dans les pâtes sèches (Logrieco *et al.*, 2004).

Les trichothécènes ont été associés à des toxicoses chroniques et fatales chez l'animal et l'homme incluant les Alimentary Toxic Aleukia ATA (Desjardins, 2007). Parmi les pathologies humaines liées aux toxines de *Fusarium*, nous pouvons citer les troubles hématologiques : thrombocytopénie (diminution du nombres de plaquettes sanguines), perturbation de l'hémostase (réaction anti- hémorragique), leucopénie et agranulocytose (diminution du nombre de globules blancs) (Boutigny, 2007 ; Montibus, 2013).

1.4.Composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques considères comme des métabolites secondaires, sont des molécules spécifiques du règne végétal sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1993).

A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (Mompon et *al.*, 1998). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre

variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et *al.*, 2004). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (Harbone, 1993).

Les composés phénoliques les plus rencontrés dans les céréales sont les acides caféique, férulique, chlorogénique et p-coumarique. Ce sont des composés aromatiques qui contiennent au moins un groupement carboxylique et un cycle phénolique (Pons, 2010). Ces acides phénoliques peuvent être solubles ou encore liés à la paroi. Ils peuvent donc jouer un rôle dans le renforcement de la paroi ou encore comme molécules antifongiques lorsqu'ils sont solubles ou lorsque la paroi est dégradée sous l'activité d'enzymes fongiques de dégradation des parois végétales.

1.4.1. Quelques axes actuels des recherches concernant les composés phénoliques :

Les composés phénoliques ont été impliqués depuis longtemps dans certains aspects de la physiologie de la plante. (Volpert et *al.*, 1995). Mais c'est dans le domaine de la régulation du transport polarisé que l'intervention de certains composés phénoliques (regroupés sous le nom de phytotropines) est la plus significative (Jacobs et Rubery, 1988 ; Brunn et *al.*, 1992 ; Katekar et *al.*, 1993), en entrant en compétition avec les transporteurs d'efflux de l'auxine. De plus, les glucosides de l'alcool dehydroconiferylrique participent vraisemblablement à la régulation de la division cellulaire (Teutonico et *al.*, 1991).

Un autre aspect concède la participation d'acides phénoliques, en particulier l'acide férulique, à la régulation de la croissance pariétale par modification du niveau de réticulation des polymères protéiques ou polysaccharidiques des parois (Iiyama et *al.*, 1994). Ces modifications rapides de réticulation peuvent être l'une des réponses quasi immédiates de la plante à l'agression par des agents pathogènes, passant par la mise en place de formes toxiques de l'oxygène (Medhy, 1994).

Les acides phénoliques sont présents chez toutes les plantes et leurs rôles dans les mécanismes de résistance ont 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).

1.4.2. Les composés phénoliques : des molécules intéressantes dans les mécanismes de résistance chez le blé

Les mécanismes naturels qui existent chez les céréales et qui permettent une réduction de l'accumulation dans les grains des trichothécènes, mycotoxines synthétisées par *Fusarium* ont été décrits par Boutigny et *al.*, 2008.

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 ou avec des propriétés pro oxydantes tel le peroxyde d'hydrogène ou les hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique ont été décrits comme des composés "modulateurs" de la biosynthèse des mycotoxines. (Ponts 2005 ; Boutigny et *al.*, 2008 ; Boutigny et *al.*, 2009).

Plusieurs acides phénoliques sont présents dans les grains de blé, il s'agit en particulier des acides férulique, vanillique, gentisique, caféique, salicylique, syringique, p-coumarique, p-hydroxybenzoïque ; et des aldéhydes tels que la vanilline et le syringaldéhyde (Naczk et Shahidi, 2006). L'acide férulique est l'acide phénolique largement majoritaire des grains (Klepacka et Fornal, 2006).

Les acides phénoliques existent sous formes solubles libres ou conjuguées (phénoliques solubles libres, phénoliques solubles esters, phénoliques solubles glycosides). La majorité des acides phénoliques sont en fait insolubles. Cependant, ils sont extraits des parois cellulaires par une hydrolyse alcaline (phénoliques insolubles liés aux parois). Boutigny thèse (Figure8)

En réponse à l'infection, chez les variétés résistantes, on observe une synthèse rapide d'acides phénoliques qui sont soit estérifiés aux polysaccharides pour consolider et stabiliser les parois cellulaires, soit libres. Chez les variétés sensibles, on observe, au contraire, une diminution de la synthèse d'acides phénoliques qui sont soit dégradés par

le pathogène, soit leur biosynthèse est inhibée par les mycotoxines (inhibiteurs de la synthèse protéique). (Galtier P. *et al.*, 2009).

Plusieurs travaux ont mis en évidence une possible relation entre les teneurs en acides phénoliques des grains (acide férulique et acide *p*-coumarique) et le degré de résistance à la fusariose chez le maïs (Assabgui, Reid *et al.* 1993; Beekrum, Govinden *et al.* 2003) ainsi que chez le blé (McKeehen, Busch *et al.* 1999; Siranidou, Kang *et al.* 2002).

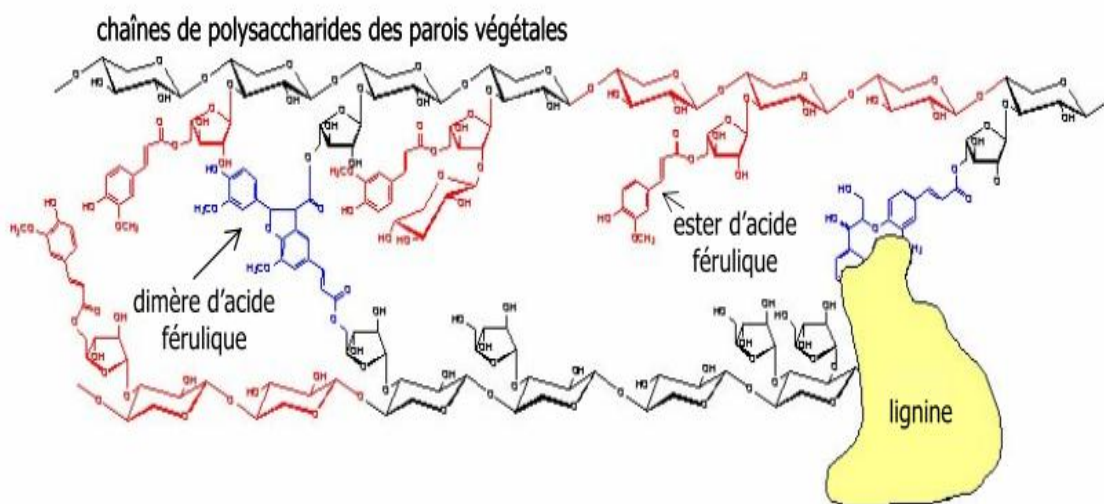


Figure 8 : Les acides phénoliques dans la paroi cellulaire.

Les acides phénoliques des parois cellulaires lient les chaînes polysaccharidiques entre elles et avec les autres composés des parois, incluant la lignine.

Source : <http://www.chemie.uni-hamburg.de/lc/ballaststoffe.html>

D'autres études ont montré le rôle des composés phénolique sur la biosynthèse des mycotoxines. Par exemple, une concentration de 0.1 mM d'acide férulique ajoutée au milieu de culture réduit la production de tricothécène B synthétisé par *fusarium culmorum* jusqu'à 84% et inhibe également les gènes *Tri* (*Tri* 4, *Tri* 6, *Tri* 5, *Tri* 10, *Tri* 12, *Tri* 101) impliqués dans la voie de biosynthèse des mycotoxines .

D'une autre part Desjardins a montré, sur une culture de *F.sporotrichioide* ayant subi un traitement avec de flavone ou de furanocoumarins, que le taux de la toxine finale est diminué mais le trichodiène (le premier intermédiaire de la voie de biosynthèse des trichothécènes) s'était accumulé. L'interprétation de ces résultats était que la conversion de trichodiène en trichothécène oxygéné est bloqué par les composés phénoliques ajoutés. (Desjardins et al ,1988).

L'ensemble de ces résultats sont prometteurs quant à l'utilisation de ces molécules en tant que biofongicides.

1.4.3. Molécules antifongiques et « anti-mycotoxines »

Les acides phénoliques ont été décrits comme des molécules antifongiques efficaces. Leur capacité à inhiber la croissance de champignons toxigènes a été illustrée vis-à-vis d'*Aspergillus* (Chipley and Uraih 1980; Nesci, Gsponer et al. 2007) et *F. proliferatum* (Beekrum, Govinden et al. 2003). Leur efficacité serait alors étroitement liée à leur caractère plus ou moins lipophile (Park *et al.*, 2004 , Kim *et al.*, 2007).

La résistance au *Fusarium* est déterminée par l'efficacité des mécanismes de défense de l'hôte activés en réponse à l'attaque du pathogène. Ces mécanismes de défense de la plante face à l'infection peuvent résulter par la modification de la paroi cellulaire.

Ainsi en réponse à l'infection, des acides phénoliques seraient synthétisés rapidement et polymérisés dans la paroi cellulaire pour la renforcer (Siranidou et *al.*, 2002). Les acides phénoliques (tel que l'acide férulique) sont présents dans la paroi primaire des céréales (Harris et Hartley 1980).

Les plantes peuvent aussi transformer chimiquement la toxine par des activités métaboliques entraînant la dégradation ou la détoxification des mycotoxines. Parmi les stratégies de détoxification, la glycosylation des trichothécènes B est un processus naturel qui existe chez le blé. Concernant leur capacité à inhiber la production de mycotoxines (Boutigny, 2007 ; Boutigny et *al.*, 2009).

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. (Boutigny , 2007)

MATÉRIEL ET MÉTHODES



2. Matériel et méthodes

2.1. Extraits des acides phénoliques naturels et algue testés

Cinq extraits naturels des acides phénoliques insolubles liés aux parois des variétés de blé dur et un extrait d'algue ont été testés pour leurs propriétés antifongiques.

Au cours d'études précédentes, menées au laboratoire, des extractions des acides phénoliques ont été réalisées à partir d'épi de blé au stade Floraison de huit variétés de blés (Ben boudina2017). Alors que les variétés avaient montré une sensibilité différente à la Fusariose de l'épi selon la composition biochimique en acide phénoliques des variétés, les niveaux des acides produits étaient moins importants lorsque la variété était sensible. Ces résultats suggéraient la présence ou absence de composés responsables de cette sensibilité vis-à-vis des *Fusarium* et éventuellement ces molécules pourraient constituer un pool de composés à activité "anti mycotoxines".

Tableau 3: Les extraits d'acides phénoliques naturels testés sur la croissance fongique (Ben boudina 2017).

Variétés	TC G % <i>F.culmorum</i>	IA%	EAP
Ardente	23%	27	E1
Cham03	20%	21	E5
Djimila	25%	12,5	E6
Belikh 02	24%	21	E8
Mahon Demias	31%	27,5	E9

TCG% : Taux de contamination des grains de blé par *F.culmorum*

IA% : L'indice d'attaque

EAP : Les extraits d'acides naturels

2.2. Souches de *Fusarium*

Trois souches de *Fusarium* ont été utilisées au cours de cette étude (tableau 4). Les souches appartiennent aux espèces *Fusarium culmorum* et *F. graminearum*. Leurs spécifications ont été définies en utilisant des critères d'observation morphologiques (Nelson *et al.*, 1983) sur milieu PDA et en utilisant des techniques moléculaires de type PCR classique (données antérieures disponibles au laboratoire). Les souches utilisées pour l'étude ont été choisies pour leurs caractéristiques mycotoxinogènes différentes. En effet, elles sont de chémotype DON/ADON ou NIV/FX et ont des potentiels toxigènes différents. Ces souches ont été isolées de blé.

Tableau 4: Liste des différentes souches de *Fusarium* utilisées.

N° de la souche	Code expérimentale	Espèce	Organe d'isolement	chémotypes
1	<u>T706</u>	<u><i>F.culmorum</i></u>	<u>épis</u>	<u>NIV/FX</u>
2	<u>BD11</u>	<u><i>F.culmorum</i></u>	<u>épis</u>	<u>DON/3Adon</u>
3	<u>FG E13</u>	<u><i>F.Graminearum</i></u>	<u>épis</u>	<u>DON/3Adon</u>

(Touati et al 2016)

2.3. Effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne

2.3.1. Effet de l'acide férulique et de l'acide caféique

Deux acides phénoliques fournis sous forme de poudre commerciale (Sigma) ont été supplémentés séparément, acide caféique, et acide férulique, à 6 concentrations différentes 5/ 2,5 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,1 mM final à partir d'une solution mère à 1mM obtenue dans l'éthanol. Chaque condition de culture a été réalisée en triplicata.

Les effets des acides phénoliques sur la croissance mycélienne ont été testés par contact sur milieu solide PDA dans des boîtes de Pétri (diamètre 9 cm). Les solutions des acides férulique et caféique sont appliquées au centre de la boîte et étalées sur le milieu. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dose. Les cultures ont été placées à 25°C et le taux d'inhibition a été mesuré au bout de 7 jours d'incubation.

2.3.2. Effet des acides phénoliques naturels sur la croissance mycélienne

Les extraits naturels des AC sont testés pour leurs propriétés par voie gazeuse sur champignons cultivés en milieu PDA dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre.

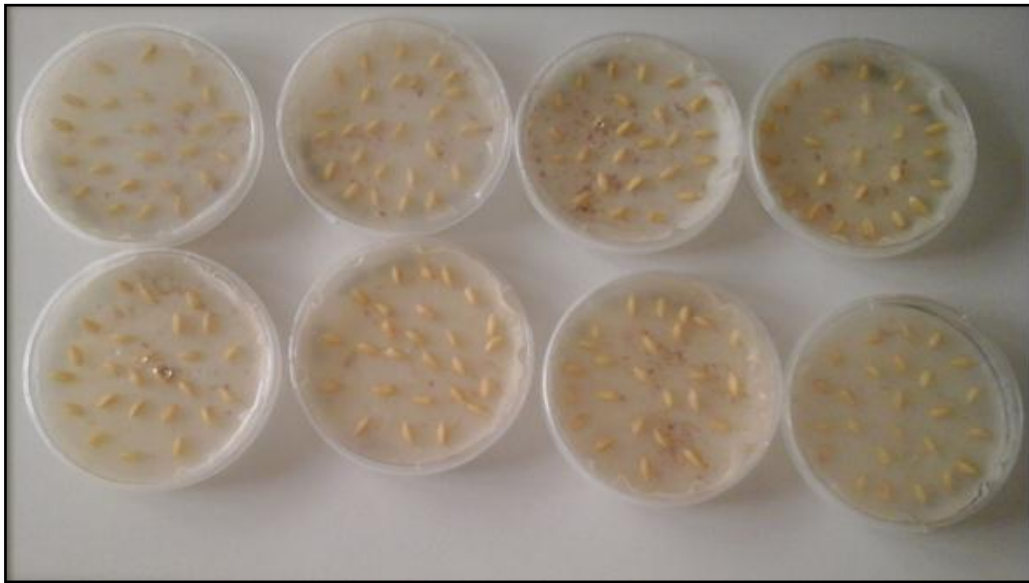
Pour ce faire, la méthode des boîtes à puits central est employée. 1 mL de suspension de spores à 10^6 spores/boîte est inoculé sur la boîte et incubée durant 16 heures afin de permettre la germination des spores. Ensuite les extraits AC sont rajoutés dans le puit central effectué sur le PDA. Les cultures ont été mises à l'étuve à 25°C et leur diamètre mesuré chaque jour pendant une semaine.

2.4. Effet des trois souches de *Fusarium* sur la croissance de la coléoptile in vitro :

Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, des rondelles de papier filtre stérilisé sont placées sur le milieu, en suite 4 ml de suspension de spores à 10^6 spores/boîte sont inoculés sur la boîte, en plus 3 ml des deux acides phénoliques (caféique, férulique) sont rajoutés, en suite on couvre avec un 2ème papier filtre stérile.

Un nombre de 25 graines de blé dur de la variété Vitron préalablement désinfectées (à l'aide de l'hypochlorite du sodium) sont déposées dans chaque boîte.

Les boîtes contenant les grains sont inoculées par les différents isolats et supplémentées en acide phénolique, ensuite sont incubées à l'obscurité à 25°C à raison de deux répétitions pour chaque isolat. Des boîtes témoin sont réalisées et incubées dans les mêmes conditions.



(Original, 2018)

Figure 9: boîtes de Pétri contenant les graines de blé inoculées par le mycélium.

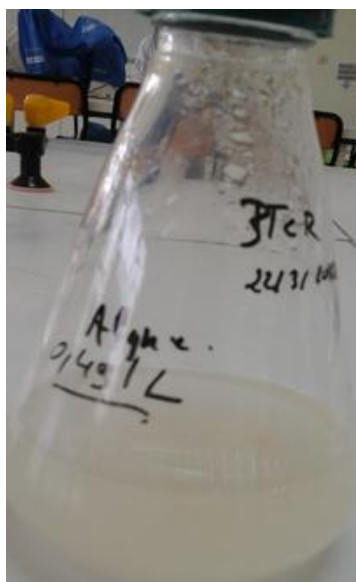
2.5. Etude de l'effet d'acides phénoliques sur la biosynthèse des TCTB chez *F. culmorum* et *F. graminearum*

2.5.1. Culture des spores dans le milieu MS

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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

CONDITIONS

15 Jours de culture à 25°C



- Milieu MS
- Acides phénolique
- Algue + *Fusarium culmorum*

MILLIEU DE CULTURE

Dosage des
toxines

Analyse
spectro

Figure 10 : Conditions de culture

2.5.2. Supplémentation des cultures par les acides phénoliques

2.5.2.1. Acides phénoliques individuels :

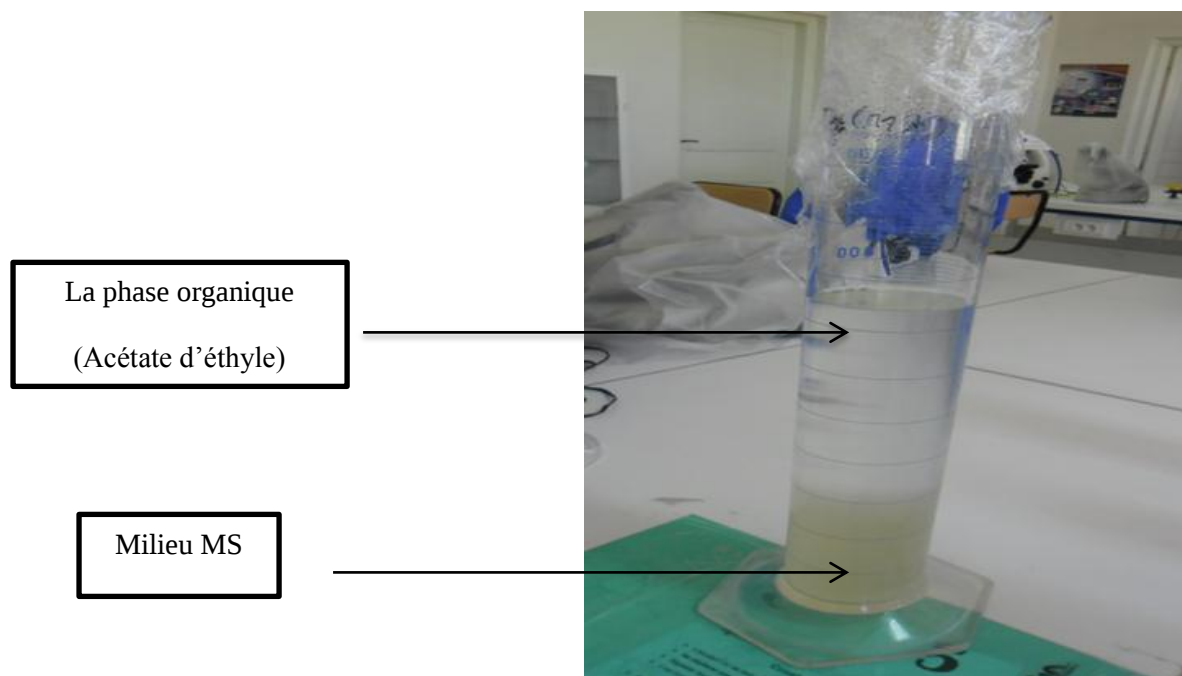
L'effet de l'acide phénolique a été testé dans des cultures réalisées dans des flacons contenant de milieu de culture liquide MS (*Mycotoxin Synthetic Medium*) de Vogel (1956) inoculées avec une suspension de spores à la concentration finale de 10^6 spores / ml.

Le milieu de culture liquide MS a été réparti aseptiquement dans des fioles erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml pour chacun. Les milieux de culture seront ensemencés avec une suspension de spores de chaque isolat afin d'avoir une concentration en spore finale égale à 10^5 spores/ml.

Des doses de 9 mg de l'acide caféique et de 9,7 mg de l'acide férulique, 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.

2.5.3. Extraction des mycotoxines sur un milieu liquide

Après 15 jours d'incubation, un volume de suspension de milieu MS est versé dans une éprouvette graduée avec deux volumes d'acétate d'éthyle. Après la décantation (30-60 min), et par une pipette stérile le surnageant (éthyle acétate) est récupéré dans un autre erlenmeyer. Ce dernier est placé dans le rota-vapeur sous une température de bain marie qui égale 44°C et une rotation de 282 rpm. Après l'évaporation totale de la phase liquide, l'extrait sec est récupéré par l'ajout de 2 ml de méthanol/eau (1/1, v/v), et enfin cette solution obtenue est récupérée par une micropipette stérile dans un tube en verre bien fermé par un bouchon.



(Original, 2018)

Figure 11 : Séparation de deux phases, la phase organique et le milieu MS.

2.5.4. Méthode physique de séparation et d'analyse de TCTB

2.5.4.1. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couches minces est une méthode physique qui permet, de tester la pureté des composés et de séparer les constituants d'un échantillon entre deux phases selon leur différence d'affinité pour l'une ou l'autre phase (Anonyme, 1999).

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 verre soit plastique rigide ou en métal.

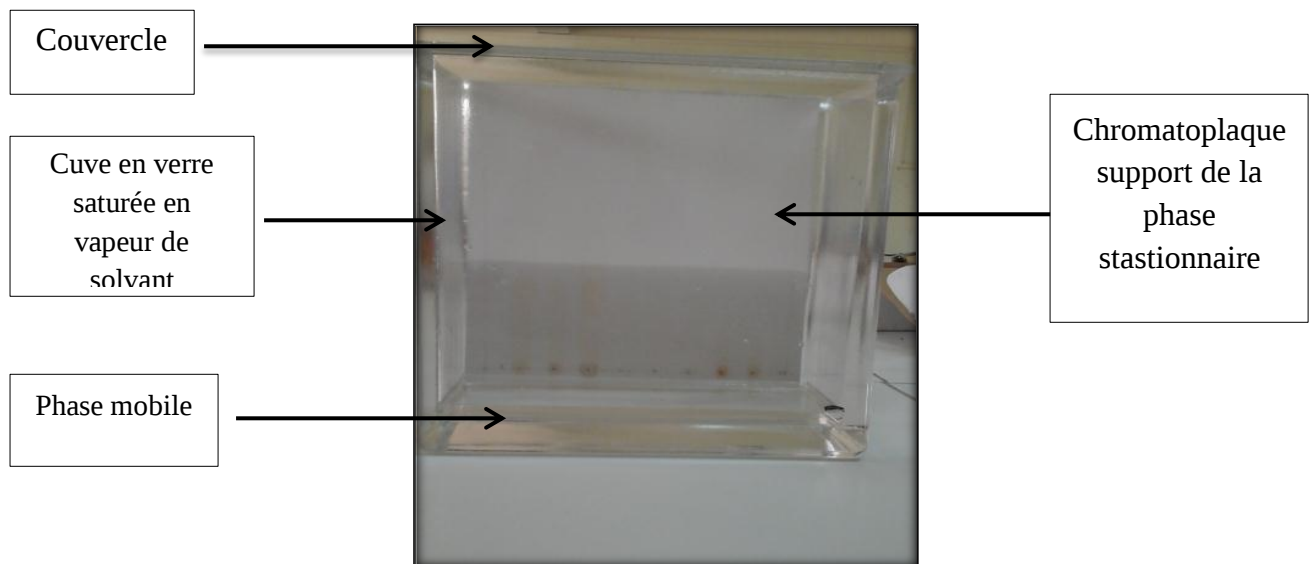
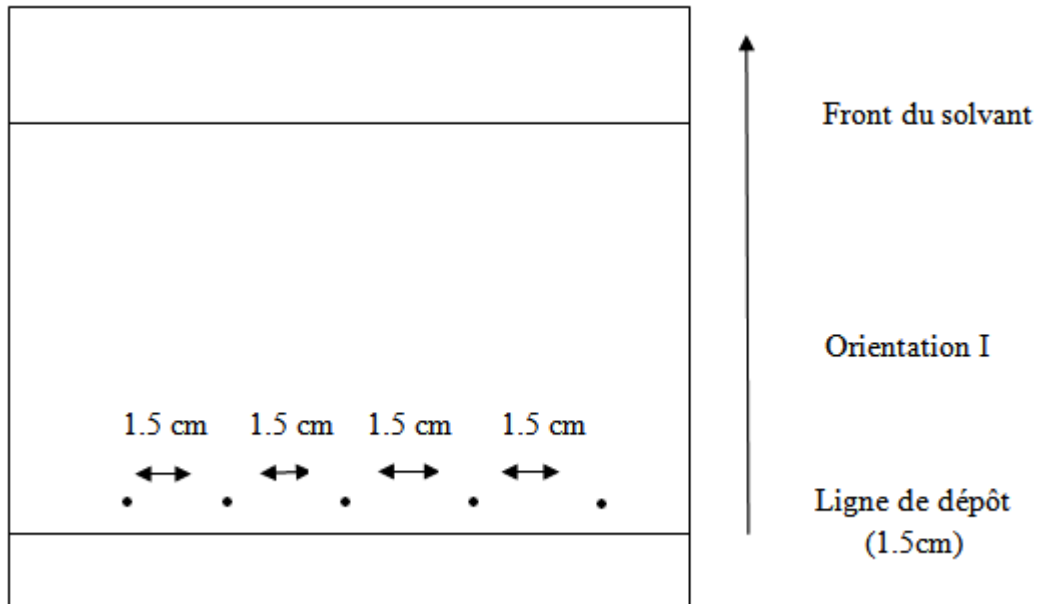
Notre choix s'est porté sur la chromatographie sur couche mince monodimensionnelle. Celle-ci est réalisée sur une plaque de CCM prêtes à l'emploi

comportant déjà une couche de 0,25 de silicagel Après les avoir réactivées dans une étuve à 110°C pendant deux minutes ensuite les avoir refroidies (Gorst Allman et *al.*, 1979), la plaque est spottée immédiatement où nous avons déposés 10 spots de de chaque extrait à analyser. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'élution constitué d'acétate d'éthyle et Hexane (8/2, v/v). Respectivement.

2.5.4.2. Développement des chromatogrammes :

Le principe de cette technique consiste que les constituants de l'échantillon sont élués par mobile qui migre par capillarité vers le haut de la plaque ; ils peuvent alors être identifiés par comparaison à l'élution simultanée du témoin. Les différents constituants de l'extrait ne sont pas séparés par la même vitesse sur le trajet de migration du solvant le long de la chromatoplaque.

Les chromatoplaques sont placées dans la cuve en vapeur de solvant, en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt ponctuel et le solvant. Pour la CCM monodimensionnelle, les chromatogrammes sont développés à une distance de migration de 15 cm à l'abri de la lumière et à température ambiante, dans un solvant d'élution constitué de d'acétate d'éthyle et Hexane Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque est examinée sous UV à 254 nm et 366 nm.



(Original, 2018)

Figure 12: Préparation de CCM

Le principe de révélation repose sur la fluorescence des mycotoxines sous UV et sur la comparaison des rapports frontaux (Rf) des spots des extraits avec ceux des standards.

La technique de révélation consiste à lire les fluorescences émises par les différentes taches sous UV à une longueur d'onde 365 nm ainsi que leur rapports frontaux, puis comparés à ceux des standards.

Le rapport frontal est la distance parcourue par la mycotoxine recherchée (h) sur la distance parcourue par le solvant (H). $Rf = h / H$

2.5.4.3. Analyse des TCTB par spectrophotomètre :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

Il faut régler le zéro en plaçant le solvant dans la cuve et l'absorbance doit être nulle. Connaissant le spectre d'absorption des TCTB, nous avons fait un balayage entre longueurs d'ondes de 320 et -600 nm. La valeur retenue a été mesurée, à une longueur d'onde de 582 nm, les variations de l'intensité I d'un faisceau lumineux traversant une même épaisseur L de solution en fonction de la concentration.

RÉSULTATS ET DISCUSSION



3. Résultat et discussion :

3.1 Effet des acides phénoliques sur la croissance mycélienne

3.1.1 Effet de l'acide férulique et l'acide caféique :

La croissance du champignon a été évaluée par mesure de la croissance mycélienne effectuées après 24, 48,.....pendant 7 jours d'incubation Avec le pied à coulisse. Les figures 13 et 14 représentent la croissance mycélienne de *Fusarium culmorum* T7 et BTCT ainsi que *F.graminearum* pour les différentes conditions.

On observe que pour tous acides phénoliques étudiés comparativement au témoin, les courbes suivent la même tendance, avec une augmentation croissante du développement mycélien jusqu'à 7 jours. En effet, si on se réfère à la valeur moyenne de la croissance du mycélium, et avec la concentration 0,5Mm on passe de 2,8 pour le temps de culture 5 jours à 4,2 pour 6 jours et enfin, la masse du mycélium atteint 5,71 pour le dernier temps de culture de 7 jours. On peut enfin remarquer qu'à 7 jours, toutes les croissances mycéliennes sont à peu près égales ; le minimum étant pour l'acide férulique avec les trois souches à 1mM de 5,05 de mycélium et le maximum étant pour l'acide caféique à 1mM de 7 de mycélium, le témoin étant à 8,4cm.

Globalement, on n'observe pas ou peu de différence de croissance entre les acides phénoliques testés et le témoin, entre les acides entre eux et ce quel que soit le temps de culture considéré. On peut tout de même remarquer qu'à 7 jours, les échantillons supplémentés avec l'acide férulique présentent une croissance mycélienne 6,8cm inférieure à celle du témoin 8,3cm L'acide férulique aurait donc tendance à inhiber la croissance du mycélium.

Donc il n'y a pas de différence de la croissance quel que soit l'acide par rapport au témoin ; ainsi les acides n'ont pas d'effet sur la croissance du mycélium de *F.culmorum* et *F.graminearum*. En effet aux cours de travaux antérieurs, où les cultures ont été effectuées en présence d'acides phénoliques, il a été démontré que les acides phénoliques sont toxiques envers certains champignons. Cependant leurs effets dépendent largement des conditions de culture. (Elad, 1992).

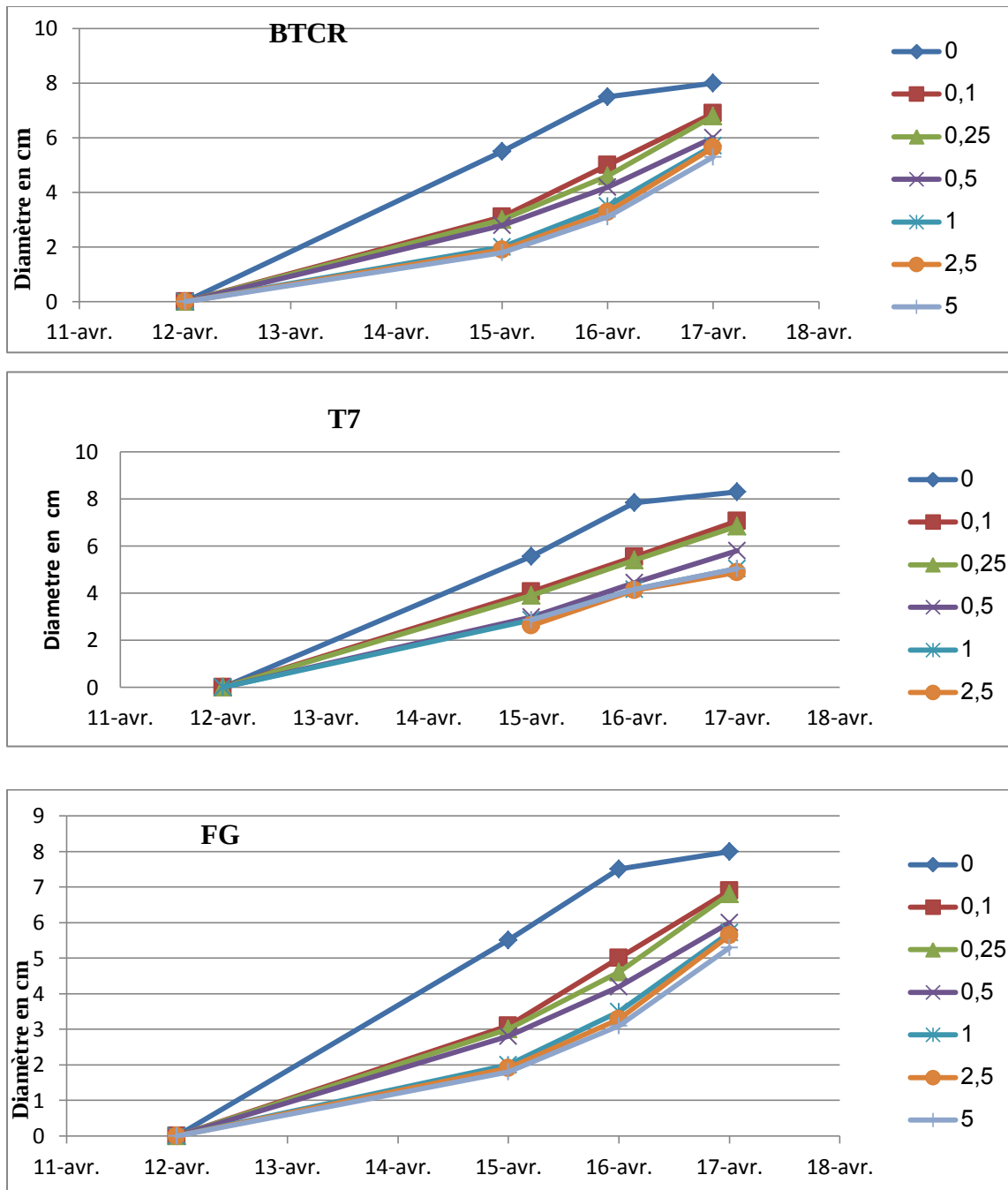


Figure 13 : Effet de l'acide férulique à différentes concentrations sur la croissance de *Fusarium culmorum* pour différents temps de culture.

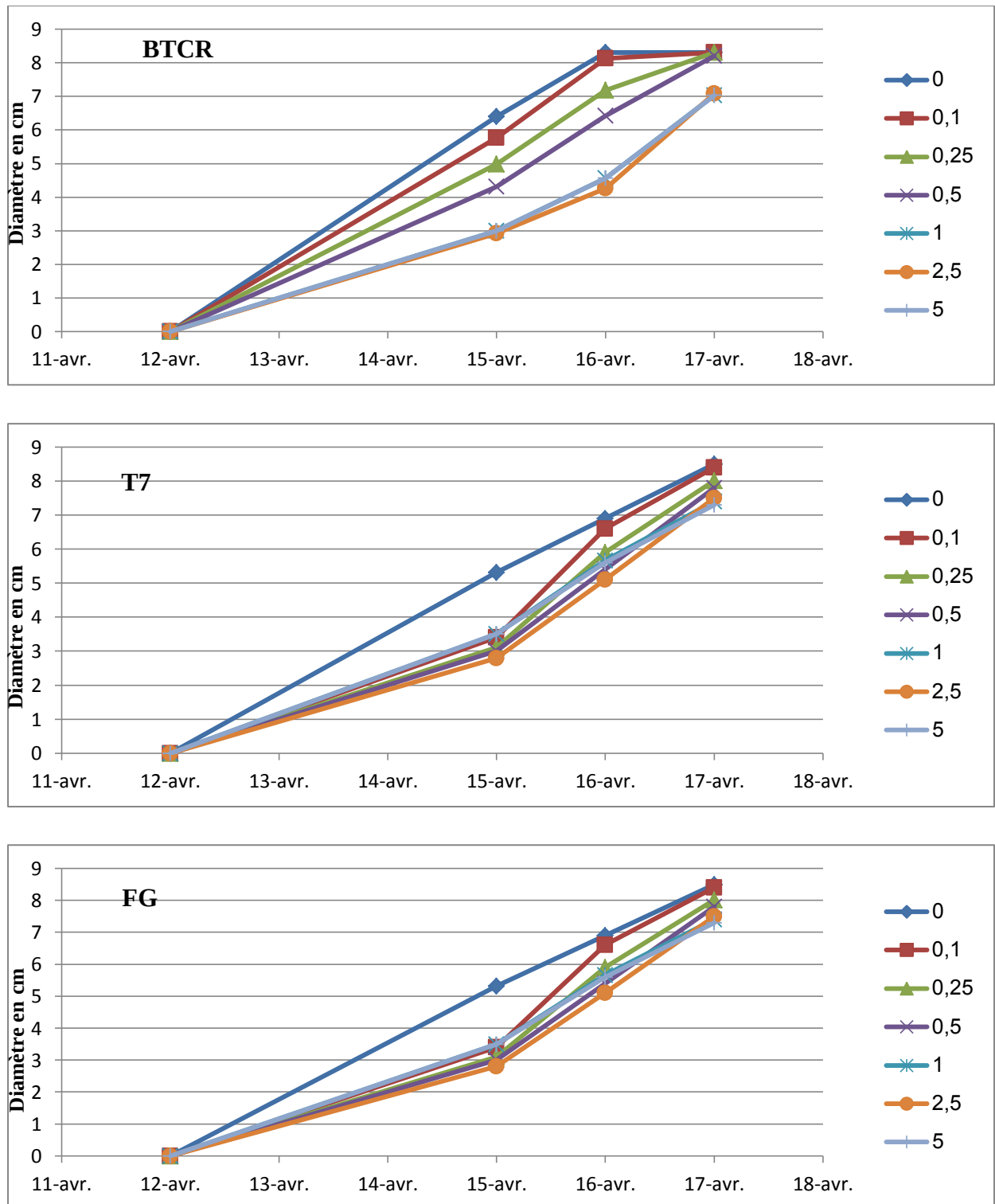


Figure 14 : Effet de l'acide caféique à différentes concentrations sur la croissance de *Fusarium culmorum* pour différents temps de culture.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Beekrum *et al.*, (2003) qui a montré que l'acide férulique inhibe la production de fumonisines B1 par *F. verticillioides* de 90% sans affecter la croissance mycélienne

3.1.2 Effet des extraits organiques sur la croissance mycélienne :

Trois souches de *Fusarium* ont été testées. Une seule concentration a été testée pour chacun des extraits des cinq variétés de blé : 0,5 µg/g. Nous avons constaté que le développement de BTCT n'est pas affecté quel que soit la variété et l'acide considérés, On peut tout de même remarquer que les extraits E1 et E9 semble avoir plus d'effet sur *F.graminearum*. Cependant le T7 supplémentés avec les acides (E1, E5, E6, E8) présentent une croissance mycélienne affaibli inférieure à celle du témoin. Pour l'acide (E9) nous avons obtenu une inhibition très importante du mycélium de T7.

Divers acides phénoliques également présents dans le blé ont été testés pour leurs effets sur la biosynthèse de TCT B par *F. culmorum*, en particulier l'acide sinapique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'acide syringique, l'acide férulique, l'acide *p*-OH benzoïque, l'acide gallique, l'acide vanillique et l'acide protocatéchuique. La présence de ces différents acides phénoliques dans le blé a été rapportée par plusieurs auteurs (Onyencho et Hettiarachchy, 1992 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2006).

Nous pouvons déduire d'après nos essais des acides naturels que l'effet des acides phénoliques sur les *Fusarium* diffèrent selon leur composition chimique.

D'après 'Boutigny (2007) les dérivés de l'acide cinnamique (acides sinapique, caféique, *p*-coumarique et férulique) ont tous un effet inhibiteur de la biosynthèse des TCT B alors que les dérivés de l'acide benzoïque, à l'exception de l'acide syringique, ont un effet activateur.

3.2 Effet de *Fusarium* spp. supplémentés par l'acide férulique et caféique sur la croissance de la coléoptile in vitro

Ce test de pathogénicité est réalisé à une température de 25 °C. Le degré d'agressivité des isolats de *Fusarium* spp. est exprimé par le pourcentage de réduction de la croissance du coléoptile.

Les résultats obtenus montrent que les isolats de *Fusarium* induisent des pourcentages de réduction de la croissance de coléoptile élevés par rapport aux boîtes supplémentées en acide

caféique et férulique. En effet nous avons obtenu un pourcentage de réduction respectivement de 98% ; 95% ; 95% pour BTCCR, T7 et FG dans les boites sans acides ajoutés.

Nous avons également noté le nombre de grains germés avec des acides ajoutés dans le milieu de culture. Lorsque la souche est inoculée dans une boite supplémentée par l'un des deux acides étudiés le pouvoir pathogène des trois *Fusaria* diminue beaucoup plus rapidement ; en effet, à 4 jours le nombre de grains germés a augmenté (Figure 15).



Figure 15: grains germés avec des acides ajoutés dans le milieu de culture.

Nous avons bien retrouvé le pourcentage de réduction que l'on attendait et ces acides agissent surtout sur la biosynthèse des TCTB. Les pourcentages de réductions pour l'acide férulique avec les trois souches sont respectivement de 40% ; 45% et 40% et pour l'acide caféique nous avons noté respectivement des réductions de 50% ; 45% et 52% avec BTCCR ; T7 et FG.

Tableau 5 : Effet des deux acides phénoliques férulique et caféique sur les *Fusarium* dans la réduction de la croissance de la coléoptile des grains de blé.

Espèces	Réduction de la croissance du coléoptile (%) sans acide	Effet acide férulique	Effet acide caféique
<i>F.culmorum</i> (BTCCR)	98%	40%	50%
<i>F. culmorum</i> (T7)	95%	45%	45%
<i>F.graminearum</i> (FG)	95%	40%	52%

Encore une fois nous remarquons l'effet des acides testés sur les TCTB facteur d'agressivité, qui diminue par la suite la pathogénicité des souches de *Fusarium*.

Plusieurs études ont suggéré un rôle des mycotoxines de *Fusarium* en tant que facteurs d'agressivité *in planta* (Desjardins et al., 1996 ; Desjardins et Hohn, 1997, Proctor et al., 1995 ; Harris et al., 1999 ; Proctor et al., 2002 ; Yao et al., 2005 ; Maier et al., 2006).

3.3 Etude de l'effet d'acides phénoliques et extrait d'algue sur la biosynthèse des TCTB chez *F. culmorum* et *F. graminearum*

Au cours de notre étude, nous avons remarqué des développements morphologiques différents du mycélium en fonction des fioles Erlenmeyer. Ces différences de développements morphologiques du mycélium peuvent être reliées aux différences de niveaux de TCT B produits intra expérimentations (Boutigny . 2007)

Pour les cultures supplémentées en acide ferulique, caféique et extrait d'algue on observe que la teneur en TCTB est inférieure à celle dans le milieu sans acide (témoin) pour trois cultures fongiques, ceci est expliqué par la couleur jaune du milieu non supplémenté (Figure 16).

Chaque composé candidat a une concentration déterminée précédemment, qui a été additionné au milieu de culture liquide inoculé avec les différentes souches de *Fusarium*. La production de DON, et NIV analysée par méthode CCM, sera comparée entre des milieux témoins et des milieux supplémentés. Les molécules candidates seront ainsi classées selon leur capacité à inhiber cette production.

La lecture de la plaque CCM sous la lampe UV permis de constater. Une belle séparation qui s'est produite sur la plaque des bandes linéaires. Avec des densité différentes et qui émettent une fluorescence bleu. Pour la plupart des spots. Cependant cinq taches ont attiré notre attention , il s'agit AC/FG, AC/BTCR/, AF/FG, AF/BTCR ou il n'y a pas eu d'absorbance et de fluorescence.

Sur la figure, on peut observer que l'AC a provoqué une légère augmentation de la synthèse de NIV par comparaison avec les témoins. Dans le cas AC avec FG et BTCR pas de production de TCTB. Cependant pour l'AF une augmentation de la production de mycotoxines NIV a été observée chez T7, nous avons remarqué que l'AF a inhibé la production des TCTB chez FG et BTCR. Ceci met en évidence une différence de sensibilité vis-à-vis de l'acide férulique selon les souches de *F. culmorum*.

L'extrait d'algue semble avoir un effet sur la biosynthèse des TCTB concentrations dépendantes puisque seulement la concentration à 0.5mM inhibe la production de toxines. Nos résultats sont en accord avec de Bily, (2003).

Il a été montré qu'à 50 µg/mL, l'acide férulique inhibe 57% de la production de trichothécènes B par *F. graminearum*

Les acides *p*-coumarique, syringique et férulique inhibent les niveaux de TCT B (DON) produits de 85%, 72% et 90% respectivement. (Boutigny 2007). Les effets de ces mêmes acides phénoliques sur la biosynthèse de TCT B par la souche INRA 319, de chémotype NIV/FX, sont moins prononcés.

Les propriétés antioxydantes des acides phénoliques pourraient jouer un rôle dans leur effet modulateur de la mycotoxinogénèse. Les trichothécènes sont synthétisés à partir du trichodiène par une série d'oxygénations (Desjardins *et al.*, 1993). Par conséquent, les modifications des paramètres oxydatifs du milieu de culture pourraient interférer avec le métabolisme secondaire du champignon et moduler les niveaux de trichothécènes produits (Ponts, 2005).

3.4 Résultat d'analyse des TCTB par spectrophotomètre

Parallèlement, on a réalisé sur les milieux de culture un dosage spectrométrique de 300nm à 600nm pour voir si la couleur du milieu pouvait être un indicateur de la teneur en TCTB.

Les résultats des dosages spectrophotométriques de nos milieux de culture nous ont permis de sélectionner 1 longueur d'ondes intéressante. En effet, pour cette longueur d'ondes, on pouvait remarquer des pics d'absorbance pour tous les échantillons. Grâce à ça, nous avons réalisé des tests statistiques sur une longueur d'onde de 582nm. Ces analyses statistiques étaient nécessaires pour savoir si l'absorbance à cette longueur d'onde était corrélée avec la teneur en TCTB. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel STAT BOX.

Pour les trois variables souche, acides les analyses de la variance ont montré des résultats hautement significatifs pour le facteur 1 (souches), facteur 2 (biomolécule) et l'interaction F1 * F2 ($p < 0.0001$).

La comparaison multiple des moyennes (CMM) des AC et Algue en utilisant le test de Newman – Keuls à 5%, a montré que le groupe (A) représente le témoin qui a produit le plus de toxine suivi par le groupe B avec une faible accumulation de toxine presque la moitié de A alors que le groupe C et D représente respectivement les plus faibles quantités de toxines.

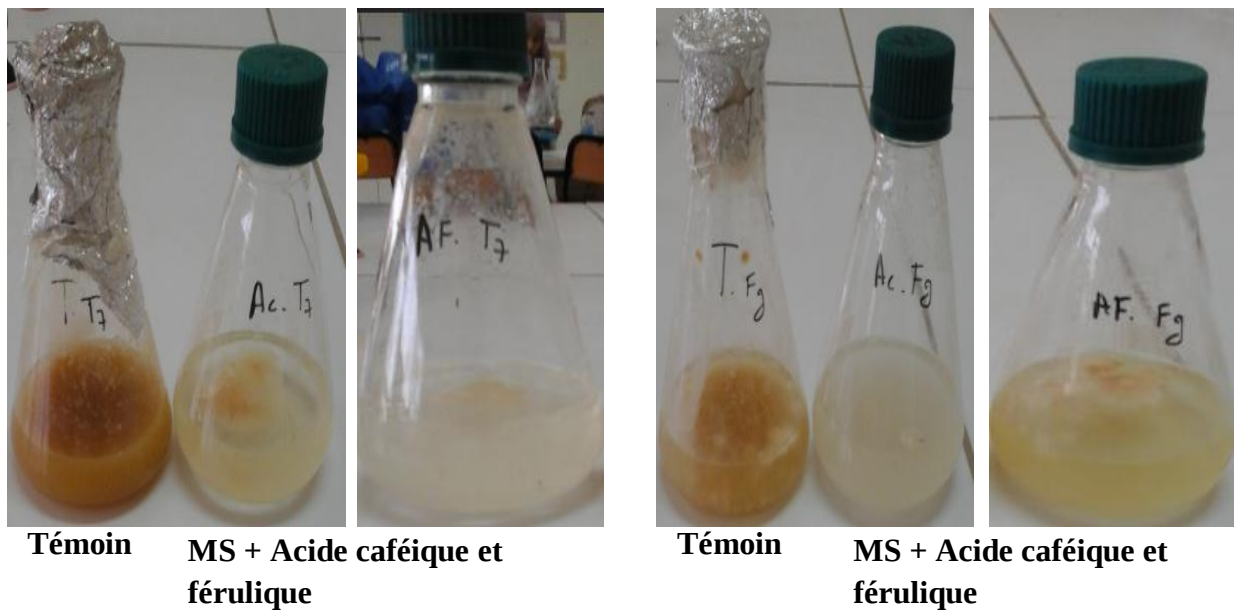


Figure 16 : Illustration des développements morphologiques différents du mycélium en fonction des acides phénoliques et extrait d'algue supplémentés.

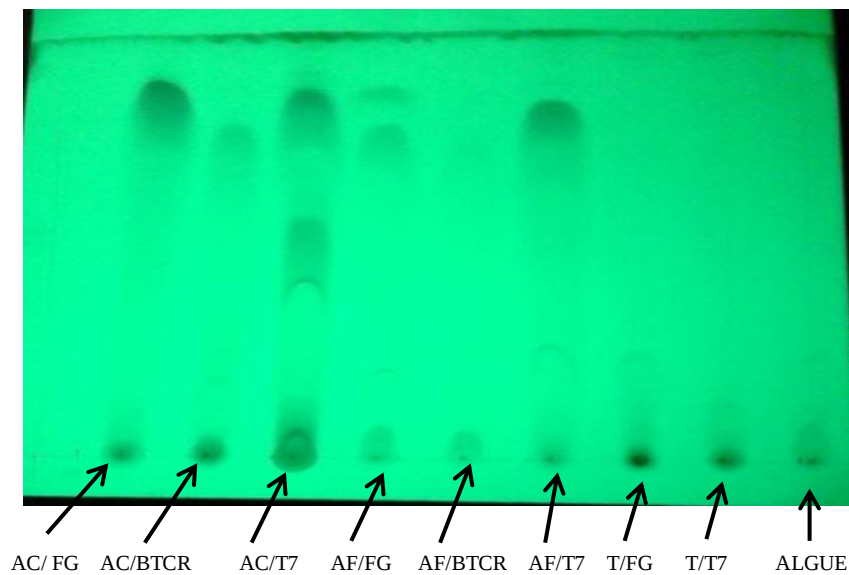


Figure 17: Révélation de la plaque CCM sous les rayons UV 254.

Tableau 6: Répartition des isolats en groupes homogènes selon l'analyse CMM de biomolécule (test de Keuls à 5%)

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes			
3	T	2,410	A			
2	AF	1,375	B			
4	ALG	1,006	C			
1	AC	0,666	D			

DO/582 nm

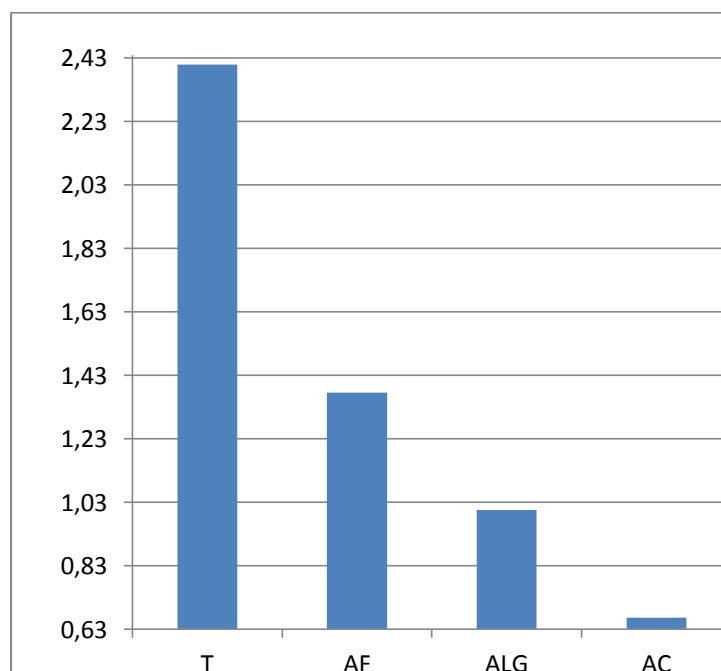


Figure 18: Effet des AC, AF et ALG sur la biosynthèse des TCT B par la souche de *F. culmorum* cultivée sur milieu MS.

3.5 Discussion

Les acides phénoliques en tant que molécules candidates, nos résultats montrent clairement une action inhibitrice de certains acides phénoliques sur la toxinogénèse de *Fusarium*, quelle que soit la concentration testée ou la souche utilisée

Les acides caféique et férulique ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse des deux souches de *F. culmorum* et *F. graminearum* de chémotype DON et sans effet pour la souche *F. culmorum* de chémotype NIV. La supplémentation des cultures par ces extraits n'a pas d'effet sur la croissance fongique

Cependant, nos résultats confirment ceux de Boutigny (2007) et Pons, (2005) que les acides phénoliques seraient des inhibiteurs potentiels très puissants de la mycotoxinogénèse. Les perspectives seraient de séparer et de purifier les différentes formes oligomériques que contient cet extrait ou de les synthétiser chimiquement afin de les tester individuellement pour leur effet sur la biosynthèse des toxines.

De plus, dans des cultures de *Fusarium* supplémentées par ces extraits naturels d'acides phénoliques, les résultats obtenus par Ben boudina (2016) ont clairement mis en évidence l'inhibition totale de la biosynthèse des toxines.

Cette toxicité peut être liée aux propriétés lipophiles des acides phénoliques (Giraud *et al.*, 1995) permettant le franchissement de la membrane. Après pénétration les acides phénoliques ont de multiples cibles potentielles. Ce sont essentiellement des inhibiteurs d'activité enzymatique oxydasique et hydrolytique. Boutigny (2007) avait déterminé la lipophilicité de nombreux acides phénoliques par le temps de rétention en méthode d'analyse de ces composés par HPLC dont les deux acides que nous étudions. Le classement pour nos deux acides est le suivant du moins lipophile au plus lipophile : acide caféique (18.9 min), acide férulique (33.1 min).

Conclusion

Les acides phénoliques ont fait l'objet d'un certain nombre d'études parmi lesquelles certaines se sont attachées à montrer leur rôle inhibiteur de la toxinogénèse *in vitro*, suggérant leur implication *in planta*.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des effets différents des acides phénoliques et une biomolécule d'extrait d'algue sur le développement fongique et la biosynthèse de TCTB. En effet, On observe que pour tous acides phénoliques étudiés comparativement au témoin, les courbes suivent la même tendance, avec une augmentation croissante du développement mycélien jusqu'à 7 jours.

On peut tout de même remarquer qu'à 7 jours, les échantillons supplémentés avec l'acide férulique présentent une croissance mycélienne légèrement inférieure à celle du témoin. L'acide férulique aurait donc tendance à inhiber la croissance du mycélium.

Nous avons également vu que des extraits naturels des cinq variétés de blé semblent avoir plus d'effet sur *F.graminearum* et T7. En effet ces souches présentent une croissance mycélienne affaiblie inférieure à celle du témoin. Cependant le BTCT n'est pas affecté quel que soit la variété et l'acide considérés.

Les résultats de l'étude de l'effet de *Fusarium* spp. supplémentés par l'acide férulique et caféique sur la croissance de coléoptile *in vitro*, montrent que les isolats de *Fusarium* induisent des pourcentages de réduction de la croissance de coléoptile élevés par rapport aux boîtes supplémentées en acide caféique et férulique.

Lors de l'étude de l'effet d'acides phénoliques et extrait d'algue sur la biosynthèse des TCTB chez *F. culmorum* et *F.graminearum* nous avons observé pour les cultures supplémentées en acide férulique, caféique et extrait d'algue que la teneur en TCTB est inférieure à celle dans le milieu sans acide (témoin) pour les trois cultures fongiques, ceci est expliqué par la couleur jaune du milieu non supplémenté.

Les résultats de CCM montrent que les acides férulique, caféique et l'extrait d'algue semblent inhiber la biosynthèse des TCTB.

L'étude de la relation entre l'absorbance de nos milieux et la teneur en TCTB par dosages spectrophotométriques nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'absorbance à 582 nm et la teneur en TCTB. Ainsi, il serait possible d'estimer la présence de TCTB dans un milieu par simple dosage spectrophotométrique.

Si un résultat majeur devait être retenu de ce travail de mémoire, il s'agirait :

➤ **Une implication potentielle des acides phénolique dans les mécanismes de résistance à *Fusarium* et à sa production de toxines chez le blé.**

Suite à ce travail, les perspectives que nous proposons sont :

Une meilleure compréhension des processus naturels permettant de limiter l'accumulation des mycotoxines dans la plante est nécessaire et pourrait ouvrir des voies pour la sélection de variétés possédant des activités métaboliques ou des compositions des grains appropriées, ce qui permettrait d'élargir les choix pour la réduction du "risque mycotoxique". Il serait intéressant d'établir une relation entre contenu en acides phénoliques et sensibilité à l'accumulation de trichothécènes B

Actuellement, l'utilisation de variétés résistantes à l'accumulation de mycotoxines constitue la voie préférentielle pour limiter la contamination des céréales par les toxines de *Fusarium*. Ces études ouvrent de nouvelles perspectives pour la sélection de variétés résistantes à l'accumulation de trichothécènes.

Reference

- Arseniuk E., Goral G. & Czembor H.J. (1993) Reaction of triticale, wheat and rye accessions to graminaceous *Fusarium* spp. infection at the seedling and adult plant growth stages. *Euphytica*, 70, 175-183.
- Bai G. et Shaner G., 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease* 78, 760–766.
- BALZER, A., TARDIEU, D. & BAILLY, J. D. 2004. Les trichothécènes: nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *revue Med.Vet*, 155, 299 - 314.
- Bechtel D.B., Kaleikau L.A., Gaines R.L. & Seitz L.M. (1985) The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry*, 62, 191-197.
- Bennett, J. W. & KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497 516.
- Bottalico, A. & PERRONE, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108,
- Boulal, H., ZAGHOUE, O., EL MOURID, M. & REZGHI, S. 2007. Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blé et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie).
- Boutigny, A. L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. thèse Université Bordeaux I.
- Boutigny, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
- Boutigny, A., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2008. Natural mechanisms for plant resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *Journal of European Plant Pathology*, 121, 411-423.

- Brennan, J. M. & FAGAN, B. 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109(6): 577-587.
- Champeil A., Doré T. et 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.
- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins chemistry, genetics, and biology, St. Paul, Minnesota U.S.A.
- Dexter J.E., Marchylo B.A., Clear R.M. & Clarke J.M. (1997) Effect of *Fusarium* head blight on semolina milling and pasta-making quality of durum wheat. *Cereal Chemistry*, 74, 519-525.
- Feillet, P. 2000. Le grain de blé composition et utilisation. In: INRA EDITIONS, Paris, France, p. 308.
- Feldman M., 2001. Origine of cultivate wheat .Dans Bonjean A.P et W.J.Angus Ed The world wheat book :a history of wheat breeding .Intercept Limited , Andover , Angleterre .,p:3-58.
- Feliachi, K., AMROUN, R. & KHALDOUN, A.2001. Impact de la sécheresse sur la production des céréales cultivées dans le Nord de l'Algérie. *Céréaliculture*, 35, 28-37.
- Fourar, R. Lessard, F. **2015**. Evaluation expérimentale de la sensibilité aux attaques du charançon du riz de variétés d'espèces céréalières cultivées en Algérie, 24, n.5, 921p.
- Goswami R.S. & Kistler H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- Goswami R.S. & KISTLER H.C. 2004 Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- Hamadache, A. 2013. *Elément de phytotechnie générale-Grandes cultures- Principaux itinéraires techniques des principales espèces de grandes cultures pluviales cultivées en Algérie et en Afrique du Nord (agriculture conventionnelle) Tome I: Le blé*, p.230.
- Harris, P. J. & R. D. HARTLEY 1980. Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology* 8(2): 153-160.

- Kim K.-H., TSAO R., YANG R. & CUI S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95, 466-473..
- Laraba I, BOUREGHDA H, ABDALLAH N, BOUAICHA O, OBANOR F, MORETTI A, GEISER DM, KIM HS, MCCORMICK SP, PROCTOR RH, KELLY AC, WARD TJ, O'DONNELL K. 2017. Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol* 103:34-41.
- Lee, T., HAN, Y., KIM, K., YUN, S. & LEE, Y. 2002. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2148-2154.
- Logrieco, A. & VISCONTI, A. 2004. An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe, Kluwer Academic Publ.247p
- Lori, G. A., SISTERNA, M. N., SARANDON, S. J., RIZZO, I. & CHIDICHIMO, H. 2009. *Fusarium* Head Blight in wheat : impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection* 28: 495-502.
- Mascher F., Michel V. et Browne RA., 2005. Sélection de variétés de blé et de triticales résistantes à la fusariose sur épi. *Revue suisse Agric.* 189-194.
- MASCHER F., MICHEL V. & BROWNE R. A, 2005. Sélection de variétés de blé et de triticales résistantes à la fusariose sur épi . *Agroscope*. 375: 189-194 p
- Mathieu CB., Nathalie S., Denis Pageau M Sc. et Sylvie R., 2012. Pour en savoir plus sur la Fusariose.7p.
- McCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
- McKEE J.D., BUSH R.H. & FULCHER R.G. 1999. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1476-1482.

- Montibus, M., PONTS, N., ZEHRAOUI, E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Fgap1-mediated response to oxidative stress in trichothecene-producing *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Reports*, 60, 410
- Nelson P. E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, PA.
- Parry D.W., Jenkinson P. & McLeod L. (1995) *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review*. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Pereyra SA., Dill-Macky R. et Sims AL., 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease* 88. 724-730.
- Pirgozliev SR., Edwards SG., Hare MC. et Jenkinson P., 2003. Strategies For the control of *Fusarium* head blight in cereals / *European Journal of Plant Pathology*. 109. 731–742.
- Placinta, C. M., J. P. F. D'MELLO, ET AL. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78(1/2): 21-37.
- Pons, S. 2010. Importance du choix variétal dans la maîtrise des niveaux de contamination en trichothécènes B des récoltes de maïs. Bordeaux, Université Bordeaux 1: 274.
- Rastoin, J.L. & BENABDERRAZIK, E. 2014. Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb Pour un co-développement de filières territorialisées. *IPEMED*. p32.
- Richard M., 2004. La Fusariose chez les céréales dans le Canada atlantique. 1-3.
- SIMPSON, D.R., THOMSETT, M.A., ET NICHOLSON, P. 2004. Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environmental Microbiology* 6: 79-87.
- Soltner D, 1990, Les grandes productions végétales céréalières, plantes sarclées- prairies 16^{ème} Ed, collection sciences techniques agricoles. 464p.
- Sweeney, M. J. & DOBSON, A. D. W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 149-163.

Wegulo S., Jackson T A., Baenziger S., Carlson M. et Hernandez J., 2008. Fusarium Head Blight of Wheat. 8p.

Wegulo, S. N. 2012. Factors Influencing Deoxynivalenol Accumulation in Small Grain Cereals. Toxins, 4, 1157-1180.

Zaghouane.O; AMRANI.R ET AMRANI.M. 2013. Production céréalière de la campagne 2012/2013 par espèce. Bulletin des grandes cultures. Ed. ITGC. 8p

Résumé

La Fusariose de l'épi (FHB) est une maladie du blé responsable de pertes considérables de production. Les espèces impliquées peuvent conduire à la contamination des grains par diverses mycotoxines, qui sont dangereuses pour la santé humaine et animale.

L'existence de sensibilités différentes à l'accumulation de mycotoxines au sein des variétés de blé dur disponibles est connue. La résistance à l'accumulation de mycotoxines chez certaines variétés pourrait résulter de processus naturels qui permettraient de limiter l'accumulation des mycotoxines dans les grains.

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.

Dans ce contexte, le but de ce mémoire est d'étudier les effets des acides phénoliques sur la croissance mycélienne et la production des toxines. Des cultures liquides et solides de *F. culmorum* et *F. graminearum* ont été supplémentées par des extraits de l'acide férulique et caféique, des extraits naturels d'acides phénoliques obtenus à partir de cinq variétés de blé, ainsi qu'un extrait d'algue. Une CCM a été réalisée pour analyser l'effet des composés modulateurs de la biosynthèse de mycotoxines par *Fusarium*.

Les résultats obtenus montrent que ces composés phénoliques et aussi l'extrait d'algue inhibent la biosynthèse des TCTB sans affecter le développement fongique.

Mots clés: résistance à FHB, *Fusarium*, composés phénoliques, mycotoxines, blé.

الملخص

فيوزاريوم لفحة رأس (FHB) هو مرض القمح مما تسبب في خسائر كبيرة في الإنتاج. يمكن للأنواع المعنية أن تؤدي إلى تلوث الحبوب بمختلف أنواع السموم الفطرية ، التي تشكل خطورة على صحة الإنسان والحيوان. و من المعروف أن وجود حساسيات مختلفة لتراكم السموم الفطرية في أصناف durum المتاحة. قد تكون مقاومة تراكم السموم الفطرية في بعض الأصناف ناتجة عن عمليات طبيعية تحد من تراكم السموم الفطرية في الحبوب. حاليا ، وصفت مركبات مختلفة مع خصائص مضادة للأكسدة ، مثل المركبات الفينولية ، البيبتيدات أو الكاروتينات على أنها مركبات "مُشكِّل" من التخليق الحيوي للميوكوتوكسين.

في هذا السياق ، فإن الهدف من هذه الرسالة هو دراسة آثار الأحماض الفينولية على نمو الغزل وإنتاج السموم ، وتم استكمال الثقافات السائلة والصلبة من *F. culmorum* و *F. graminearum* بمستخلصات من حمض الفيروليك وحمض الكافيين ، والمستخلصات الطبيعية من الأحماض الفينولية التي تم الحصول عليها من خمسة أنواع من القمح ، فضلا عن مستخلص من الأعشاب البحرية. تم تطبيق الفصل الكروماتوغرافي لتحليل تأثير المركبات التي تقوم بتحويل التخليق الحيوي للميوكوتوكسين بواسطة *Fusarium*.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه المركبات الفينولية وكذلك مستخلص الطحلب يثبط عملية التخليق الحيوي لـ TCTB دون التأثير على التطور الفطري.

الكلمات المفتاحية: مقاومة FHB ، الفيوزاريوم ، المركبات الفينولية ، السموم الفطرية ، القمح.

Abstract

Fusarium head blight (FHB) is a wheat disease causing considerable production losses. The species involved can lead to grain contamination by various mycotoxins, which are dangerous for human and animal health.

The existence of different sensitivities to the accumulation of mycotoxins in available durum varieties is known. Resistance to mycotoxin accumulation in some varieties may be the result of natural processes that would limit the accumulation of mycotoxins in grains.

Currently, various compounds with antioxidant properties, such as phenolic compounds, peptides or carotenoids have been described as "modulator" compounds of mycotoxin biosynthesis.

In this context, the aim of this thesis is to study the effects of phenolic acids on mycelial growth and toxin production. Liquid and solid cultures of *F. culmorum* and *F. graminearum* were supplemented with extracts from ferulic acid and caffeic acid, natural extracts of phenolic acids obtained from five varieties of wheat, as well as an extract of seaweed. A TLC was applied to analyze the effect of compounds modulating the mycotoxin biosynthesis by *Fusarium*.

The results obtained show that these phenolic compounds and also the alga extract inhibit the biosynthesis of TCTB without affecting the fungal development.

Key words: resistance to FHB, *Fusarium*, phenolic compounds, mycotoxins, wheat.