

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université des Frères Mentouri - Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**



N° d'Ordre :19/D3C/2019  
N° de Série :01/MB/2019

*Thèse*

En vue de l'obtention du diplôme de

**Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle**

**Option : Bioprocédés et Biotechnologie, Applications Mycologiques**

**Caractérisation moléculaire et par MALDI-TOF MS des espèces fongiques phytopathogènes inféodées aux céréales et mise en évidence de l'impact de l'utilisation des antifongiques azolés sur la résistance des souches**

Présentée par :

**ZAAMOUCHI Ahlem**

**Soutenue : Le 20/02/2019**

*Devant le jury :*

Président :	M <sup>r</sup> DEHIMAT L.	Prof. Université des Frères Mentouri – Constantine1
Directeurs de thèse :	M <sup>me</sup> MIHOUBI I.	Prof. Université des Frères Mentouri – Constantine1
	M <sup>r</sup> PICOT S.	Prof. Université Claude -Bernard, Lyon1
Examineurs :	M <sup>r</sup> GUECHI A.	Prof. Université Ferhat Abbas-Sétif
	M <sup>me</sup> ALATOU R..	M.C.A Université des Frères Mentouri – Constantine1

**Année universitaire**  
**2018-2019**

## ***Remerciements***

Je remercie avant tout ***DIEU*** tout puissant, pour la volonté, la santé, et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années d'études afin je puisse en arriver là.

J'adresse mes plus vifs remerciements à ma directrice de thèse, Professeur MIHOUBI Ilhem., pour m'avoir confié et avoir encadré ce travail de thèse. Merci pour votre disponibilité, votre rigueur, votre sympathie et pour les connaissances que vous m'avez transmises au cours de ce travail et également au cours de mon stage. Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère sympathie et de mon profond respect.

Des remerciements particuliers s'adressent à mon Co-Encadreur Professeur PICOT Stéphane responsable du Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, (Université Claude- Bernard Lyon 1) et son équipe pour avoir accepté de m'accueillir aussi chaleureusement et suivi de très près le déroulement de mon stage

J'adresse mes remerciements et exprime ma gratitude au Professeur Dehimat Laid qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements au Docteur Alatou Radia qui m'a apporté son aide et m'a fait l'honneur d'accepter, d'examiner et de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Guechi Abdelhadi Professeur à l'université de Sétif pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je voudrais adresser de sincères remerciements au Professeur Hamidechi A. (UFMC1) pour m'avoir apporté son aide dans la partie bioinformatique et également, à Mme Normand (Département de Parasitologie/Mycologie La Timone, Marseille) qui a suivi la partie mutation de ma thèse.

Mes remerciements vont, également, à Mr Zaatat Adlen et Mr Merabet Brahim pour avoir mis à ma disposition les semences et m'avoir fourni gracieusement les fongicides nécessaires.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## *Dédicaces*

Je dédie ce travail à ma chère maman, qui est toujours pré de moi, à m'encourage, me conseiller, par tous les moyens. Aucun mot ne peut exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as pas cessée de faire depuis ma naissance. Merci maman que Dieu te garde et te protège.

A mon père qui s'est sacrifié jour et nuit pour mon éducation et mon bien être et qui m'a toujours encouragé.

A mes frères Alaa eddine, Imed eddine et Khalifa

Et surtout pour la personne qui a beaucoup sacrifié pour moi et que je remercie énormément, mon mari Bazine Abdelazize.

A mes enfants: Seif eddine, Amani et Ishak, je leurs souhaite tout le bonheur du monde.

A toute ma famille et toutes mes amies

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1 :</b> Les échelles de notation des stades du blé... ..	8
<b>Tableau 2 :</b> Liste des fongicides utilisés... ..	50
<b>Tableau 3 :</b> Les concentrations ( $\mu\text{l/ml}$ ) des fongicides utilisées dans le milieu PDA....	51
<b>Tableau 4 :</b> Résultats d'isolement a partir des semences de blé par la méthode de dilution (saison 2013-2014).....	56
<b>Tableau 5 :</b> Résultats d'isolement a partir des semences de blé par la méthode de dilution (saison 2014 -2015).....	57
<b>Tableau 6 :</b> Résultats d'isolement à partir des semences de blé par la méthode de papier buvard (saison 2013-2014).....	57
<b>Tableau 7 :</b> Résultats d'isolement à partir des semences de blé par la méthode de papier buvard (saison 2014-2015).....	58
<b>Tableau 8 :</b> espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par le fongicide AmistarXtra (saison 2013/2014).....	61
<b>Tableau 9 :</b> espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par le fongicide Artea330EC (saison 2013-2014).....	61
<b>Tableau 10 :</b> espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par l'AmistarXtra (saison 2014-2015).....	62
<b>Tableau 11 :</b> espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par l'Artea330EC (saison 2014 -2015).....	62
<b>Tableau 12 :</b> Aspects macroscopiques des souches isolées après 10 jours d'incubation...	64
<b>Tableau 13 :</b> Aspects microscopiques des souches isolées après 10 jours d'incubation...	66
<b>Tableau 14 :</b> Réactions (Sensibilité/Résistance) des six isolats <i>in vitro</i> à différentes doses du fongicide testé (Raxil® 060 FS) selon l'échelle de Kumar <i>et al</i> (2007).....	73
<b>Tableau 15 :</b> Réactions (Sensibilité/Résistance) des quatre isolats <i>in vitro</i> à différentes doses de fongicide testé (AmistarXtra) selon l'échelle de Kumar <i>et al</i> (2007).....	78
<b>Tableau 16 :</b> Réactions (Sensibilité/Résistance) des quatre isolats <i>in vitro</i> à différentes doses de fongicide testé (l'Artéa 330EC) selon l'échelle de Kumar <i>et al</i> (2007).....	82

## *Liste des Figures*

<b>Figure 1 :</b> Les différents stades de développement du blé.....	7
<b>Figure 2 :</b> Morphologie des graminées (exemple du blé).....	10
<b>Figure 3 :</b> Le cycle de développement des rouilles.....	21
<b>Figure 4 :</b> Le cycle de développement de la Septoriose.....	22
<b>Figure 5 :</b> Symptômes de l'helminthosporiose du blé.....	23
<b>Figure 6:</b> Cycle de développement de l'helminthosporiose du blé.....	24
<b>Figure 7 :</b> Cycle de développement de l'agent pathogène : Erysiphe graminis.....	25
<b>Figure 8 :</b> Charbon nu sur épi du blé .....	27
<b>Figure 9 :</b> épi et grains de blé caries.....	28
<b>Figure 10 :</b> Action du fongicide par contact.....	31
<b>Figure 11 :</b> Action systémique du fongicide.....	31
<b>Figure 12 :</b> Structure chimique du tébuconazole.....	34
<b>Figure 13 :</b> Structure chimique du Propiconazole.....	35
<b>Figure 14 :</b> Structure chimique du Cyproconazole.....	35
<b>Figure 15 :</b> structure chimique de l'azoxystrobine.....	36
<b>Figure 16 :</b> Fréquence totale des moisissures associées aux semences de blé dur non traitées et traitées par le Raxil® 060 FS durant les deux saisons.....	59
<b>Figure 17 :</b> Fréquence des espèces isolées par la méthode indirecte à partir des semences de blé dur non traitées et traitées par le Raxil ® 060 FS durant la saison 2013-2014.....	59
<b>Figure 18:</b> Fréquence des moisissures isolées par la méthode indirecte à partir des semences de blé dur non traitées et traitées par le Raxil® 060 FS durant la saison 2014-2015.....	60

**Figure 19** : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences d’ARNr 18s. Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. 0.1 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.....69

**Figure 20** : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium griseofulvum* en fonction des doses de Raxil® 060 FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes).....74

**Figure 21** : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium glabrum* en fonction des doses de Raxil® 060 FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes).....75

**Figure 22** : Diamètre moyen de croissance d’*Aspergillus flavus* en fonction des doses de Raxil® 060 FS .....75

**Figure 23** : Diamètre moyen de croissance d’*Aspergillus niger* en fonction des doses de Raxil® 060 FS.....76

**Figure 24** : Diamètre moyen de croissance d’*Aspergillus niger* en fonction des doses de Raxil® 060 FS.....76

**Figure 25** : Diamètre moyen de croissance d’*Alternaria alternata* en fonction des doses de Raxil® 060 FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes).....77

**Figure 26** : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium griseofulvum* en fonction des doses de l’AmistarXtra.....79

**Figure 27** : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium glabrum* en fonction des doses de l’AmistarXtra.....79

**Figure 28** : Diamètre moyen de croissance de *Trichoderma harzianum* en fonction des doses de l’AmistarXtra.....80

**Figure 29** : Diamètre moyen de croissance d’*Alternaria alternata* en fonction des doses de l’AmistarXtra.....80

**Figure 30** : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium griseofulvum* en fonction des doses de l’Artea 330EC.....83

**Figure 31** : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium glabrum* en fonction des doses de l’Artea330EC.....83

**Figure 32** : Diamètre moyen de croissance de *Trichoderma harzianum* en fonction des doses de l’Artea 330EC.....84

**Figure 33** : Diamètre moyen de croissance d'*Alternaria alternata* en fonction des doses de l'Artea 330EC.....84

**Figure 34** : Action de Raxil®060 FS sur la croissance mycélienne de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium glabrum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* sur le milieu PDA amandé au fongicide et sans fongicide (Témoin).....88

**Figure 35** : Action de l'AmistarXtra sur la croissance mycélienne de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium glabrum*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* sur le milieu PDA amandé au fongicide et sans fongicide (Témoin).....90

**Figure 36** : Action de l'Artea330EC sur la croissance mycélienne de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium glabrum*, *Trichoderma harzianum* et *Alternaria alternata* sur le milieu PDA amandé au fongicide et sans fongicide (Témoin).....93

**Figure 37** : photo du gel de la PCR pour les trois régions (promoteur, CDS1 et CDS2)...96

**Figure 38** : alignement des séquences par Clustal O (1.2.4) pour *A.tubingensis*.....99

## *Liste des abréviations*

ABC: ATP Binding Cassettes

BLAST: Blast local Alignement Search Tool

CHCA : acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique

CIC : Conseil International des Céréales

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale inhibitrice

dNTP : Désoxynucléotide triphosphate

EC : Concentré émulsionnable

FAO: Food and Agriculture Organisation

FS: Suspension fluide

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HR : Hautement Résistant

HS : Hautement Sensible

IBS : inhibiteur de biosynthèse des stérols

IDM : inhibiteurs de la déméthylation

ITS : Internal Transcribed Spacer (Espaceur Interne Transcrit)

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MFS: Major Facilitator Super family

MR : Modérément Résistant

Mt : millions tonnes

NCBI: National Center For Biotechnology Information

OAIC : Office Algérien Interprofessionnel des Céréales



ORF: Open Reading Frames

Pb: paires de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDA: Potato Dextrose Agar

PDAac: Potato Dextrose Agar acidifié

R : Résistant

S : Sensible

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

TFA : Acide TriFluorocétique

## ملخص

تعد الحبوب الشتوية، وخاصة القمح الصلب، العنصر الأساسي للنظام الغذائي الجزائري، لما له من أهمية إستراتيجية في تغذية الإنسان و علف الحيوانات. العديد من الأمراض الفطرية بإمكانها مهاجمة محاصيل الحبوب ، بما في ذلك القمح الصلب. هذه الهجمات يمكن أن تسبب خسائر كبيرة عندما تكون الأصناف المستخدمة حساسة. بالإضافة إلى ذلك فإن هذه الفطريات الممرضة تعتبر مسؤولة أيضا عن الأمراض البشرية. ولهذا فإن اللجوء إلى استخدام المبيدات الفطرية هو أمر لا مفر منه لحماية النبات من جميع الملوثات الخارجية. تضمن أفضل حماية لنبات القمح بواسطة نوعين من المنتجات: المبيدات الفطرية و الحشرية. فيما يخص المبيدات الفطرية، أثبتت التريازولات فعاليتها لأكثر من ثلاثين سنة. التريازولات هي مثبطات التخليق الحيوي للستيرولات. في الوقت الحالي ، أصبح للعض الفطري مقاومة للمبيدات نتيجة الاستخدام المفرط لهذه الأخيرة. آلية المقاومة الأكثر شيوعا لدى العفن الفطري هي طفرة الجين *cyp51A* الذي يرمز إلى انزيم 14- $\alpha$  stérol . *déméthylase* المبيدات الفطرية الأزولية تثبط هذا الإنزيم، مما يؤدي إلى تعطيل التركيب الحيوي للإرغوستيرول وبالتالي استنزاف هذا الأخير وتراكم نواتج سامة. في هذا السياق قمنا بإجراء دراسة مقارنة لعينات من بذور وأوراق وأذنين القمح الصلب المعالجة بالمبيدات الفطرية الأزولية : Raxil® 060 FS ، Amistar® Xtra وArtea®330EC وأخرى غير معالجة من أجل تقييم فعالية التريازولات و تقييم درجة حماية نبات القمح بعد العلاج بالمبيدات الفطرية في ولاية قسنطينة (الجزائر). وفقا للتحليل الميكولوجي للعينات ، تم عزل 114 سلالة. الصنفان *Aspergillus* و *Penicillium* هما الأكثر هيمنة . بعد تعريف الأصناف بالتقنية الجزيئية و تقنية مصفوفة المساعدة بالليزر و الامتزاز التائني في وقت الرحلة الكتلية الطيفية ، ستة أصناف مقاومة للعلاج بالمبيدات الفطرية تم اختيارها لدراسة تأثير هذه الأخيرة ، وهي فطر : *A. flavus* ، *A. alternata* ، *T. harzianum* ، *P. griseofulvum* ، *P. glabrum* و *A. tubingensis* إن دراسة حساسية هذه العزلات تعنى في البداية بتقييم نشاط المبيدات الفطرية ،المذكورة سابقا، داخل المختبر بتقنية الانتشار .بالإضافة إلى ذلك ، فإن النتائج المتحصل عليها تم تأكيدها من خلال تحليل إحصائي أثبت أن المبيدات الفطرية التي تم اختبارها تتسبب في حدوث انخفاض في نمو العزلات مقارنة بالشواهد .بالإضافة إلى ذلك ، تم الكشف عن الطفرات المتسببة في المقاومة في جين *cyp51A* للعزلات السابقة الذكر بواسطة تحليل هذا الأخير . والنتائج الم تحصل عليها تمت معالجتها من خلال مناهج المعلوماتية الحيوية ( bioinformatiques ) من أجل استغلالها.

## الكلمات المفتاحية

الجين *cyp51A*، القمح الصلب، مبيدات فطرية التريازولات، المقاومة، مصفوفة المساعدة بالليزر و الامتزاز التائني في وقت الرحلة الكتلية الطيفية

## *Abstract*

Winter cereals including wheat remain the staple food of the Algerian diet and show a strategic importance in both human and animal nutrition. Many fungal diseases may attack wheat farmings, These attacks may cause great loss when the used varieties are sensitive. The mildews are phytopathogenic But, they are eventually responsible of human pathologies. The treatment protects the plant from every external contamination. The best phytosanitary protection of wheat farmings is assured via two types of treatments; fungicidal and insecticide. The fungicides if used to destroy pathogenic fungi which attach the farmings, seeds and harvested products. Currently, the mildews are becoming resistant in the environment, because of the exercised pressure through the use of fungicides. The most common mildew's resistance mechanism is the mutation of the *cyp51* gene coding 14 $\alpha$ -Demethylase sterol. The azolated antifungals inhibit this enzyme, leading to blocking the biosynthesis of the ergosterol which leads to deplete the ergosterol And to an accumulation of toxic metabolites. In this context, we have conducted a comparative study both seed samples, leaves and wheat spikes: one of them is treated by the azolated fungicide of type: Raxil® 060 FS, l'Artea330EC and Amistar® Xtra while the other is kept untreated in order to evaluate the efficiency of triazoles and the degree of protection of the wheat farming after a fungicidal treatment in the province of Constantine (Algeria). According to the mycological analysis of the samples, 114 strains have been isolated; the species of *Aspergillus* and *Penicillium* genus are the most dominant. 6 species resistant against the treatments were selected for the study of fungicidal effects including (*A. flavus*, *A. tubingensis*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *T. harzianum* and *A. alternate*). The study of the sensitivity of these isolates covers firstly the evaluation of the *in vitro* activity of the pre-described fungicides via a diffusion technique. In addition, the obtained results validated with a statistical analysis revealed that the tested fungicides caused a decrease in the pycnidial Coating compared to control samples. Secondly, the detection of resistance mutations in the isolate's *cyp51* gene was accomplished through the analysis of this latter. The obtained results were treated using a bioinformatics approach in order to exploit them.

**Key words:** Durum wheat, Triazole fungicides, MALDI-TOF MS, Resistance, *cyp51A*.

## *Table des matières*

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iv
Résumés.....	vi

<b><i>Introduction</i></b> .....	1
----------------------------------	---

## ***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

<b>CHAPITRE I: LES CEREALES</b> .....	4
I.1. Généralités sur les céréales Définition.....	4
I.1.1. Les céréales dans le monde.....	4
I.1.2. Les céréales en Algérie .....	4
I.1.2.1. La céréaliculture .....	4
I.1.2.2. Les zones de production des céréales .....	5
I.2. Le blé dur .....	5
I.2.1. Biologie du blé .....	6
I.2.1.1 Cycle biologique .....	6
I.2.1.2. Les caractères morphologiques du blé.....	9
I.2.1.2.1 Le grain .....	9
I.2.1.2.2. L'appareil végétatif .....	9
I.2.1.2.3. L'appareil reproducteur .....	9
I.2.2. Les exigences du blé .....	10
I.2.2.1. Le sol.....	10
I.2.2.2. L'eau .....	11
I.2.2.3. La température.....	11
I.2.3. Importance de la culture du blé dur en méditerranée .....	12
I.2.4. Importance de la culture du blé dur en Algérie .....	12
I.2.5. Stockage du blé en Algérie .....	13
I.2.5.1. Le stockage traditionnel .....	13

I.2.5.2. Le stockage en sac .....	13
I.2.5.3. Le stockage en vrac .....	13
I.2. 5.4. Le stockage en silo .....	14
I.3. Facteurs de détérioration des céréales .....	14
I.3.1. Facteurs d'altération du blé .....	14
I.3.1.1. Altérations enzymatiques .....	14
I.3.1.2. Altération d'origine mécanique ou physique.....	14
I.3.1.3 Altération d'origine biologique .....	15
I.3.1.3.1. Les macro-organismes .....	15
I.3.1.3.2. Les micro-organismes .....	15
I.3.2. Effets néfastes des altérations .....	18
<b>CHAPITRE II. LES MALADIES FONGIQUES DES CEREALES EN ALGERIE.....</b>	<b>19</b>
II.1 Maladies sur feuillage.....	19
II.1.1. Les rouilles .....	19
II.1.1.1. Agents pathogènes.....	19
II.1.1.2. Symptômes.....	20
II.1.1.3. Développement de la maladie.....	20
II.1.2. Les septorioses .....	21
II.1.2.1. Agent pathogène.....	21
II.1.2.2. Symptômes.....	21
II.1.2.3. Développement de la maladie.....	22
II.1.3. Les helminthosporioses .....	22
II.1.3.1. Agent pathogène.....	22
II.1.3.2. Symptômes.....	23
II.1.3.3. Développement de la maladie.....	23
II.1.4. Oïdium .....	24
1.4.1 Agent pathogène.....	24
II.1.4.2. Symptômes.....	24

II.1.4.3. Développement de la maladie.....	24
II.2. Maladies des pourritures racinaires .....	25
II.2.1. Agent pathogène.....	25
II.2.2. Symptômes.....	26
II.2.3. Développement de la maladie.....	26
II.3. Maladies sur épi.....	26
II.3.1. Charbon nu du blé .....	26
II.3.1.1. Agent pathogène.....	26
II.3.1.2. Symptômes.....	26
II.3.1.3. Développement de la maladie.....	27
II.3.2. Carie du blé .....	27
II.3.2.1. Agent pathogène.....	27
II.3.2.2. Symptômes.....	27
II.3.2.3. Développement de la maladie.....	28
II.4. Lutte contre les maladies cryptogamiques.....	28
II.4.1. La Lutte biologique.....	28
II.4.2. La Lutte culturale.....	29
II.4.3. La Lutte génétique.....	29
II.4.4. La Lutte chimique.....	29
<b>CHAPITRE III. LES FONGICIDES.....</b>	<b>30</b>
III.1. Définition.....	30
III.2. Différentes familles de fongicides.....	30
III.2.1. Les fongicides de contact (surface).....	30
III.2.2. Les fongicides systémiques .....	31
III.2.2.1. Définitions de la systémie.....	31
III.2.2.2. Principaux fongicides systémiques.....	31
III.2.2.2.1. Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS).....	31
III.3. Mode d'action et site d'activité.....	31

III. 3.1 Les fongicides à site multiple (les multisites).....	32
III. 3.2 Les fongicides à site unique (Uni sites).....	32
III. 3.2.1 Les triazoles.....	32
III .3.2.1.1 Mode d'action.....	32
III .4 Les fongicides triazolées utilisées en agriculture Algérienne .....	32
III .4.1 Raxil® 060 FS.....	32
III .4.1.1 Compositions et dose d'utilisation.....	33
III .4.1.2 Mode d'action.....	33
III .4.1.3 Périodes d'utilisation.....	33
III .4.2 Artéa® 330EC (concentré émulsionnable).....	33
III .4.2.1 Compositions et dose d'utilisation.....	34
III .4.2.2 Mode d'action.....	34
III .4.2.3 Périodes d'utilisation.....	34
III .4.3 Amistar® Xtra.....	35
III .4.3.1 Compositions et dose d'utilisation.....	35
III .4.3.2 Mode d'action.....	35
III .4.3.3 Périodes d'utilisation.....	36

**CHAPITRE IV. LA RESISTANCE AUX FONGICIDES TRIAZOLES.....37**

IV .1 Définition.....	37
IV .2 Mécanismes de résistance aux triazolées.....	37
IV .2.1 Modification de la cible .....	37
IV .2.2 Surexpression de la cible.....	37
IV .2.3 Systèmes d'efflux : efflux accru (MDR).....	38

***ETUDE EXPERIMENTALE***

**CHAPITRE I: ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES.....39**

I.1. Matériel végétal.....	39
I.1.1. Prélèvement des échantillons .....	39

I.1.1.1. Semences de blé non traité.....	39
I.1.1.2. Semences de blé traité.....	39
I.1.1.3 Feuilles et épis de blé au stade fin tallage-début montaison (1er traitement au champ).....	40
I.1.1.4 Feuilles et épis de blé au stade floraison (2ème traitement au champ).....	40
I.2. Isolement des champignons phytopathogènes .....	40
I.2.1. Milieux d'isolement .....	40
I.2.1.1. Semence de blé dur.....	40
I.2.1.2. Feuilles et épis de blé dur.....	40
I.2.2. Méthodes d'isolement .....	41
I.2.2.1. Semence de blé dur.....	41
I.2.2.1.1. Méthode de suspension-dilution (méthode indirecte).....	41
I.2.2.1.2. Méthode du papier buvard (méthode directe).....	41
I.2.2.2. Feuilles et épis de blé dur.....	41
I.2.2.2.1. Technique directe.....	41
I.2.2.2.2. Technique de la chambre humide.....	42
I.2.3 Purification et conservation des souches isolées.....	42
I.3. Méthodes d'identification.....	43
I.3.1. Identification morphologique .....	43
I.3.1.1. Identification macroscopique.....	43
I.3.1.2. Identification microscopique.....	43
I.3.2. Caractérisation moléculaire des isolats.....	43
I.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique.....	44
I.3.2. 2. Amplification de l'ADN fongique (PCR Panfongique).....	45
I.3.2.3. Séquençage de l'ADN.....	45
I.3.2.4. Purification des séquences.....	45
I.3.2.5. Analyse des séquences.....	46
I.3.2.6. Comparaison des séquences avec la banque informatique.....	46
I.3.2.7. Analyse phylogénétique.....	46



I.3.2.8. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques.....	46
I.3.3. Identification par MALDI-TOF MS.....	47
I.3.3.1. Principe.....	47
I.3.3.2. Nettoyage de la cible.....	48
I.3.3.3. Préparation de la matrice.....	48
I.3.3.4. Préparation des échantillons et analyse spectrométrique.....	49
I.3.3.5. Traitement des données avec le logiciel Biotyper v2.1 (Bruker Daltonics).....	49

## **CHAPITRE II: DETERMINATION DU PROFIL DE RESISTANCE .....50**

II.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la technique de diffusion.....	50
II.1.1. Préparation des souches.....	51
II.1.2. Préparation des fongicides.....	51
II.1.3. Technique de diffusion.....	51
II.2. Analyse statistique.....	52

## **CHAPITRE III: DETECTION DES MUTATIONS DE RESISTANCE dans le GENE *CYP51*.....53**

III.1. Résistance par mutation de la cible <i>cyp51A</i> .....	53
III.1.1. Extraction de l'ADN fongique.....	53
III.1.2. PCR et Séquençage du <i>cyp51A</i> .....	54
III.1.3. Analyse des séquences.....	54

## ***RESULTATS ET DISCUSSION***

### **CHAPITRE I: ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES.....56**

I.1. isolement des champignons phytopathogènes du blé .....	56
I.1.1. Semences du blé.....	56
I.1.2 Feuilles et épi de blé.....	60
I.2. Identification des isolats.....	62
I.2.1. Aspect macroscopique.....	63

I.2.2. Aspect microscopique.....	65
I.3. Amplification et séquençage de l'ARNr 18S avec des amorces universelles.....	67
I.4. Analyse phylogénétique.....	68
I.5. Analyse par MALDI-TOF MS.....	69
I.6. Discussion.....	70
<b>CHAPITRE II: DETERMINATION DU PROFIL DE RESISTANCE</b> .....	72
II .1. Calcul des concentrations minimales inhibitrices (CMF) par technique de diffusion.....	72
II.1.1. Le Raxil® 060 FS.....	72
II.1.2. L'Amistar® Xtra.....	77
II.1.3. L'Artéa® 330EC.....	81
II.2. Discussion.....	93
<b>CHAPITRE III: DETECTION DES MUTATIONS DE RESISTANCE dans le GENE CYP51</b> .....	96
III.1. Séquençage de <i>cyp51A</i> .....	96
III.2. Analyse des séquences.....	97
III.3. Discussion.....	99
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	101
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	106
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	108
<b>ANNEXES</b>	

Les céréales occupent de loin, la première place quand à l'occupation des terres agricoles, parce qu'elles servent d'aliments de base pour une grande proportion de la population mondiale. En Algérie, tout comme en Afrique du Nord, la culture des céréales représente la principale spéculation et occupe une place privilégiée dans les habitudes alimentaires des populations aussi bien dans les milieux ruraux qu'urbains, de plus elle draine plusieurs activités de transformation (semoulerie, boulangerie et industrie alimentaire). En effet, l'Algérie est parmi les pays les plus grands consommateurs de blé dur au monde avec un taux d'environ 216 kg par habitant et par an (Chehat, 2007).

En Algérie, les céréales sont cultivées dans pratiquement toutes les régions des hauts plateaux situées dans les zones semi-arides et sub-humides et des grandes plaines intérieures littorales et sub- littorales. Le blé représente en Algérie la céréale la plus dominante puisque près de la moitié des emblavures lui sont consacrées (Boulay *et al.*, 2007). la culture de blé dur occupe près de 65% de la surface céréalière en Algérie, mais sa production ne couvre que 28% des besoins du pays (Annicchiarico *et al.*, 2006; Weigand, 2011). Elle a importé durant les dix premiers mois de 2013 416,29 millions de dollars pour 1,04 million de tonnes de blé dur (Ammar, 2014). Malgré les énormes progrès enregistrés dans la productivité qui ont permis d'améliorer les variétés, la fertilisation et d'assurer une meilleure protection, la production céréalière en Algérie demeure toujours irrégulière et semble être étroitement liée à un certain nombre de facteurs tant abiotiques (irrégularité dans les précipitation pluviales , techniques agricoles..), que biotiques (potentiel génétique, maladies , ravageurs, etc.), d'où la persistance d'un déficit important entre la consommation et la production. Parmi ces causes, les problèmes phytosanitaires occupent une place particulièrement importante et constituent l'un des facteurs limitant le développement et l'amélioration de ces cultures. Actuellement, bien que l'on dispose d'un arsenal considérable de nature chimique et biologique, les maladies constituent toujours une des causes importantes des pertes de rendements. Les réductions de rendement causées par les maladies et ennemis naturels des céréales , ont permis d'enregistrer à travers le monde des pertes annuels de l'ordre de 135 millions de tonnes, les blés et les orges représentent à eux seuls plus de 10% des pertes globales. En effet, le blé peut faire l'objet d'attaques induites par diverses maladies et ravageurs (virus, bactérie, insectes, champignons,..). En effet les maladies fongiques peuvent attaquer la culture de blé dur et occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et les conditions sont favorables à l'expansion de celles-ci (Boutigny, 2007).

Les moisissures tels que les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, ... ; sont à elles seules, responsables de la perte de 5% à 10% des céréales et leurs dérivés (Pfohl-Leskowicz, 1999).

La protection contre les champignons pathogènes des céréales est déterminante aussi bien en termes de rendement que de qualité des récoltes. Pour cela, les incontournables triazoles ont fait leur preuve en tant que fongicides et ce, depuis plus de trente ans. Les triazoles étant des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IDMs). Ils agissent par inhibition de la protéine 14- $\alpha$  déméthylase (*cyp51*), ce qui empêche la synthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane des cellules des champignons, et conduit à leur dépérissement.

A l'heure actuelle, le phénomène de perte de sensibilité aux fongicides développés par certains champignons pathogènes suscite de légitimes inquiétudes aussi bien dans le domaine agricole que médical. Cette diminution de la sensibilité de certaines souches aux triazoles est due, selon les auteurs, à la présence de mutation sur le gène *cyp51-A*, codant pour l'enzyme cible des antifongiques azolés (Snelders, 2012).

La question qu'on peut se poser est : l'utilisation en agriculture des fongicides favorise-t-elle l'apparition de résistance des champignons, et cette perte de sensibilité se retrouvent-elles également chez les personnes atteintes d'infections fongiques traitées aux médicaments triazoles?.

Dans ce contexte, nous prévoyons dans un premier temps, dans cette étude, de mettre en exergue le phénomène de résistance des souches fongiques aux traitements préventifs, parfois abusifs, effectués par les agriculteurs. Pour tendre vers cet objectif, nous avons inclus dans notre étude les deux types d'agriculteurs : celui qui traite ses récoltes et ses stocks avec des fongicides et un autre fellah qui ne fait pas appel aux fongicides. Ce travail sera mené conjointement sur les récoltes des deux agriculteurs, sur plusieurs saisons, avant et après chaque traitement. Pratiquement, la méthodologie préconisée sera menée comme suit :

- Isolement et identification des champignons pathogènes par les méthodes classiques
- Mise en évidence, par test de diffusion, de la sensibilité des souches aux fongicides
- Confirmation des espèces par Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) et par PCR séquençage

- Détection des mutations de résistance sur le gène CYP51A des isolats
- Etude statistique

Les résultats de l'étude nous permettront de confirmer ou pas cette résistance et par conséquence, prodiguer des recommandations sur l'utilisation de ces fongicides en agriculture.

## CHAPITRE I : LES CEREALES

### I.1. Généralités sur les céréales

Les céréales appartiennent à la famille des *Poacées* appelées (*graminées*). Il existe trois grands groupes de céréales

- un premier grand groupe formé par le blé, l'orge, le seigle et l'avoine.
- un deuxième grand groupe représenté par le maïs
- un troisième groupe ordonné autour du riz (Gguignard et Dupont, 2004).

#### I.1.1. Les céréales dans le monde

Les céréales constituent la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour la consommation humaine et pour l'alimentation animale. Le secteur des céréales est d'une importance cruciale pour les disponibilités alimentaires mondiales (Choueiri, 2003). D'après les rapports de la FAO (Food and Agriculture Organisation) de 2013, les céréales représentent 45% de l'alimentation humaine. La superficie mondiale consacrée aux céréales se situe autour de 700 millions d'hectare (ha). Le blé occupe la plus grande surface qui dépasse le tiers du total de la surface consacrée aux céréalicultures (Burney, 2011). En 2013 la FAO table sur une production céréalière mondiale de 2,479 milliards de tonnes. Le maïs, le blé et le riz viennent très largement en tête, avec 85% de ce total, le niveau de production du blé et du riz se situe dans une fourchette de 560 à 585 millions de tonne, le maïs occupe désormais la première place, avec 876 millions de tonnes en 2011. Entre 1960 et 2013, la production mondiale de blé a été multipliée par trois, la production de blé dépasse les 700 millions tonnes (Mt) (707 Mt). Le blé et le maïs sont les deux premières principales céréales cultivées dans le monde (FAO, 2013).

#### I.1.2. Les céréales en Algérie

##### I.1.2.1. La céréaliculture

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins. Les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. La production des céréales occupe environ 80% de la superficie agricole utile du pays, La superficie consacrée annuellement pour la culture des céréales se situe entre 3 et 3,5 million d'ha. Les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures (Djermoun, 2009). Selon les données de l'Office Algérien Interprofessionnel

des Céréales (OAIC) l'Algérie a produit 3 millions de tonnes de céréales en 2013- 2014 contre 4,9 millions de tonnes en 2012-2013 (Ammar, 2014). En relation avec le marché mondial, les produits céréaliers représentent plus de 40% de la valeur des importations des produits alimentaires. Les produits céréaliers occupent le premier rang (39,22 %), devant les produits laitiers (20,6%), le sucre et sucreries (10%) et les huiles et corps gras (10%). La production des céréales en Algérie est marquée aussi par une forte irrégularité, elle-même conditionnée par les aléas climatiques. Les rendements se situent entre 9 et 14 quintaux à l'hectare (Djermoun, 2009).

### **I.1.2.2. Les zones de production des céréales**

En Algérie la production de céréales se pratique dans les 48 wilayas du pays. Les plus importantes surfaces se situent au nord du pays (Benbelkacem, 2007). Elle occupe une vaste aire géographique, au relief relativement accidenté. Cette superficie est constituée de plaines, de plateaux et de chaînes de montagnes au climat très variable qui va du subhumide à l'aride supérieur, avec une présente plus importante dans la frange pluviométrique des 300-400 mm (Cadi, 2005). Selon (Feliachi, 2000), la céréaliculture Algérienne est pratiquée dans quatre grandes zones agro-climatiques.

- un espace à faible potentialité : localisé dans le sud des Hauts Plateaux (zone agropastorale), 1.800.000 ha, pluviométrie inférieure à 450 mm et rendement de 5-6 qx/ha;
- un espace steppique : pratiquée dans un écosystème fragile, avec une surface de 300.000-800.000 ha;
- un espace au niveau des zones sahariennes qui se subdivisent en deux catégories :  
La première est représentée par le système traditionnel, occupe une surface de 35.000 ha, la deuxième qui occupe une surface de 10.000 ha concerne la céréaliculture sous pivot, localisée en zones arides et semi-arides;
- un espace à haute potentialité : localisé entre les plaines littorales et sublittorales et le nord des Hauts Plateaux, occupe une superficie de 1.200.000 ha, pluviométrie entre 450 et 800 mm, rendement moyen de 10-15 qx/ha.

## **I.2. Le blé dur**

Le blé est à l'origine même de l'agriculture. Il reste, après des millénaires, la première plante cultivée au monde (Mosiniak, 2001), il compte actuellement quelques 30000 formes cultivées (Lesage, 2011). C'est une plante herbacée, monocotylédone qui

appartient au genre *Triticum* de la famille des graminées qui comprend de nombreuses espèces. On distingue essentiellement le blé tendre et le blé dur. Morphologiquement, le blé dur se différencie du blé tendre par un feuillage plus clair, totalement glabre. L'appareil végétatif est à tallage faible, à chaume long et souple (Olmedo, 1995 ; Soltner, 2005).

## **I.2.1 Biologie du blé**

### **I.2.1.1 Cycle biologique**

Le cycle de développement du blé est constitué d'une série d'étapes séparées par des stades repérés. Une période végétative durant laquelle, la plante ne se différencie que des feuilles et des racines ; une période reproductrice dominée par l'apparition de l'épi et la période de maturation qui caractérise par la formation du grain (Soltner, 2005).

Selon Soltner (2005), différentes échelles de notation ont été développées, celle de Jonard (1952), Feekes (1954) et Zadocks (1974). Elles sont basées sur l'évolution de l'aspect externe ou sur les modifications internes des organes producteurs (Tableau 1 et Figure 1).

✓**La période végétative** Elle se caractérise par un développement strictement herbacé et s'étend du semis jusqu'à la fin de tallage. Il y'a une apparition successive des premières feuilles, imbriquées les unes dans les autres au niveau du plateau de tallage. Dès que la quatrième feuille émerge, la talle primaire apparaît à l'aisselle de la feuille la plus âgée. Le tallage qui commence pendant cette phase est un simple processus de ramification (Soltner, 1980).

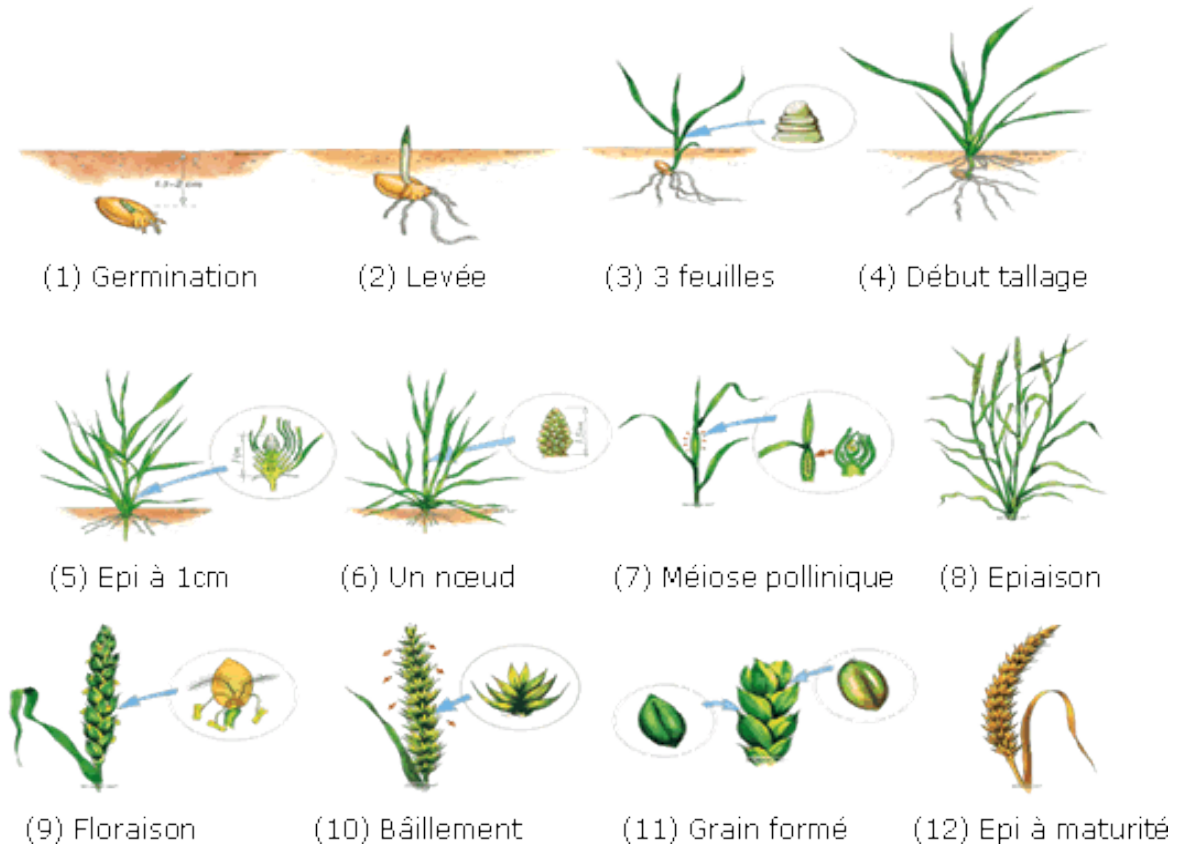
✓**La période reproductrice** Elle comprend la formation et la croissance de l'épi. Elle est caractérisée essentiellement par le passage de l'apex ou bourgeon terminal. Elle débute au cours du tallage et compte trois stades: la formation de l'ébauche épi, l'initiation florale (montaison-gonflement) et la méiose – fécondation (Hubert, 1998; Soltner, 2005).

✓**La période de maturation,**

Au cours de cette phase, l'embryon se développe et l'albumen se charge de substances de réserve (Boufnar-Zaghoune et Zaghouane, 2006). Le grain passe successivement par trois stades: grain laiteux, (augmentation du volume du poids des graines), grain pâteux (le



pois frais des grains continue à augmenter alors que celui des tiges et des feuilles diminue) et grain dur ou les grains deviennent durs et leur couleur devient jaunâtre.



**Figure 1** : Les différents stades de développement du blé  
(<http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/culture>).

**Tableau 1** : Les échelles de notation des stades du blé (Soltner, 2005).

Stade	Echelle de Feekes	Echelle de Zadocks	Echelle de Jonard	Caractéristiques
Levée	1	10 11 12 13		-1ère feuille traverse la coléoptile -1ère feuille étalée -2ème feuille étalée -3ème feuille étalée
Début tallage	2	21(1 thalle)	A	-Formation de la 1ère talle
Plein tallage	3			
Fin tallage	4	29		
Début montaison	5	30	B	Sommet de l'épi distant à 1cm du plateau de tallage
1 noeud	6	31	C1	1 noeud
2 noeud	7	32	C2	2 noeuds, elongation de la tige
	8	37		Apparition de la dernière feuille
Gonflement: épi gonfle la gaine de la dernière feuille	9	39	D (méiose du pollen)	Ligule juste visible
	10			Gaine de la dernière feuille sortie
Epiaison	10-1	40-49	E	Gaine éclatée
	10-2	50 à 59		¼ épiaisons
	10-3			½ épiaisons
	10-4			¾ épiaisons
	10-5			Tous les épis hors de la gaine
Floraison	10-5-1	60 à 69	F	Début floraison
	10-5-2			Demi-floraison
	10-5-3			Floraison complète
Formation Et Maturation Du grain	10-5-4			Formation du grain
	11-1	70à79	M0	Grain laiteux
	11-2	80à89		Grain pâteux
	11-3	9à94		Grain jaune

### **I.2.1.2. Les caractères morphologiques du blé**

#### **I.2.1.2.1 Le grain**

Les fruits de blé sont secs et indéhiscents appelés caryopses (le grain est soudé aux parois de l'ovaire) (Hadria, 2006). Il est constitué par le germe qui donne la plantule, l'amande appelée l'endosperme ou albumen, tissu de stockage qui fournit au germe les réserves nécessaires pour sa croissance et les enveloppes protectrices qui protègent la graine ou son, composées par la paroi de la graine (testa) et par la paroi du fruit (péricarpe) (Doumandji *et al.*, 2003).

#### **I.2.1.2.2. L'appareil végétatif**

L'appareil végétatif est constitué de deux parties, l'une aérienne et l'autre racinaire. Le système aérien est formé de la tige issue du caryopse et des talles partant du plateau de tallage. La tige ou chaume est constituée d'entre-noeuds séparés par des noeuds ou zones méristématiques à partir desquelles s'allongent les entre-noeuds et servent comme point d'attache des feuilles. Les feuilles sont alternées, comportant chacune une portion supérieure et une portion inférieure correspondant respectivement au limbe et à la gaine (Hubert, 1998; Jouve et Daoudi, 2001). L'appareil racinaire, chez le blé est formé de deux systèmes racinaires successifs, un système séminal dont les racines fonctionnent au cours du cycle de la plante (Grignac, 1965). Les racines séminales sont au nombre de 6 (Colnenne *et al.*, 1988) .Ce système est secondé par le système racinaire adventif qui assure la nutrition de la plante pendant la période active (Figure 2).

#### **I.2.1.2.3. L'appareil reproducteur**

Les fleurs sont regroupées en inflorescence correspondant à l'épi dont l'unité morphologique de base est l'épillet constitué de grappe de fleurs enveloppées de leurs glumelles et incluses dans deux bractées appelées les glumes (inférieure et supérieure) (Gate, 1995) (Figure 2).

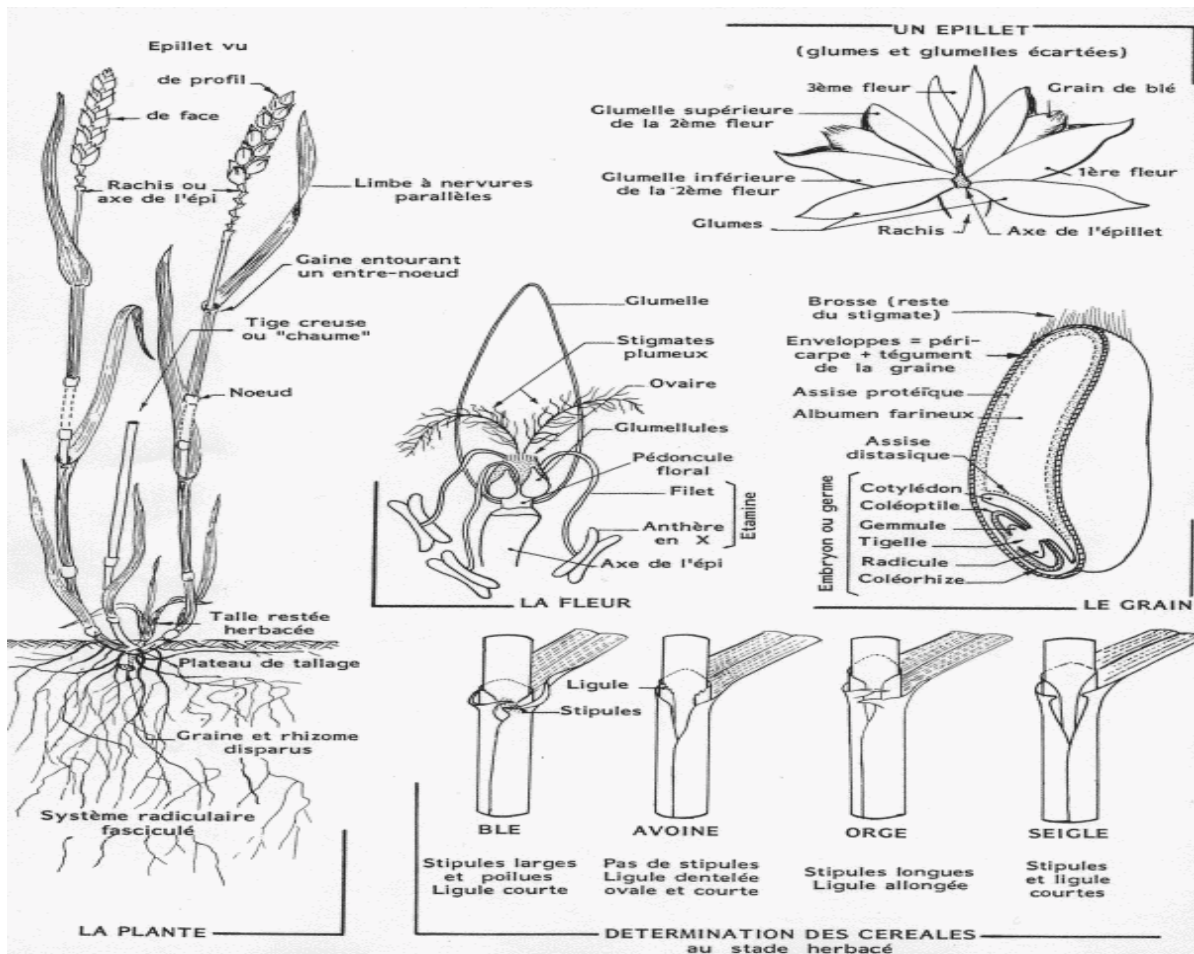


Figure 2 : Morphologie des graminées (exemple du blé) (Soltner 1998)

## I.2.2. Les exigences du blé

### I.2.2.1. Le sol

L'alimentation hydrique d'une plante est basée sur la relation sol-plante fondées sur les caractéristiques du sol et des plantes (Olios, 2006). Le sol est le support de la végétation (Girard, 2005). En effet, le sol agit par l'intermédiaire de ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. Il intervient par sa composition en éléments minéraux, en matière organique et par sa structure, et jouent un rôle important dans la nutrition du végétal, déterminant ainsi l'espérance du rendement en grain. La plante, par son système racinaire en croissance, se comporte comme un ensemble de capteurs souterrains répartis spatialement jouant le rôle de surface d'échange avec le sol, et d'un système de transport de l'eau jusqu'au collet, à la surface du sol. En absence d'obstacles, le blé colonise intensément et profondément les sols (Nicoullaud, 1995). Le sol constitue

donc pour le végétal une retenue d'éléments nutritifs dont le niveau de disponibilité marque le rayon de développement racinaire (Meartens et Clauzel, 1989; Bonnefoy, 2007). Les espèces blé et orge prospèrent sur une gamme assez variée de sols et l'optimum semble être des terres neutres, profondes et de texture équilibrée. En sol peu profond, le rendement en grain des céréales est pénalisé (El Mourid et *al.*, 1992 in Boulal et *al.*, 2007).

Selon Soltner (1999), il y a trois caractéristiques qui font une bonne terre à blé :

- Une texture fine, limono-argileuse, qui assurera aux racines fasciculées du blé une grande surface de contact donc une bonne nutrition;
- une structure stable, qui résiste à la dégradation par les pluies d'hiver. Le blé n'y souffrira pas d'asphyxie et la nitrification sera bonne au printemps;
- Une bonne profondeur et une richesse suffisante en colloïdes argile et humus sont capables d'assurer la bonne nutrition nécessaire aux forts rendements.

#### **I.2.2.2. L'eau**

L'eau est un facteur de l'environnement qui influence la quasi-totalité des réactions physiologiques des végétaux. Il constitue le véhicule des éléments nutritifs et assure les réactions métaboliques. Cet élément est indispensable à la croissance et au développement de la plante. En effet, l'eau et l'état d'hydratation des tissus des végétaux interviennent pour la production de matière sèche. De nombreuses études soulignent l'effet pénalisant du manque d'eau au cours du stade épiaison au stade grain laiteux pâteux. Un manque d'eau lors de la phase de reproduction engendre une chute importante du rendement, selon (Soltner, 2005), la réalisation des phases végétatives chez la culture du blé nécessite des besoins en eau. De plus, l'humidité excessive du sol est néfaste à l'installation du système racinaire en profondeur. Au cours de la phase de montaison et jusqu'à la floraison les besoins en eau de la culture sont considérables et peuvent s'évaluer à 180 mm (mars et mai). Après la floraison, le blé devient très résistant à la sécheresse.

#### **I.2.2.3. La température**

Le rendement dans un environnement donné est influencé d'une manière directe ou indirecte par des facteurs morphologiques, physiologiques, et environnementaux (Prasad *et al.*, 2007). La température est la caractéristique environnementale qui contrôle le développement de la plante, elle conditionne à tout moment la physiologie du blé. Une

température supérieure à 0°C est exigée pour la germination (Bouzerzour, 1998 ; Tahir, 1998 ; Soltner, 2005). En effet la température est d'une manière générale déterminante dans la croissance et le développement de l'apex de la plante. Des températures basses de l'ordre de 5°C gênent la sortie des feuilles dont le limbe peut alors être déformé. La déformation a lieu sur les bords du limbe, en général dans son tiers supérieur lui conférant un aspect « étranglé ». A l'épiaison, le froid peut gêner la sortie des épis et l'on constate parfois qu'ils se plient lorsque les barbes ou les becs de glumes restent accrochés au niveau de la ligule de la dernière feuille (Gate, 1995). Au stade 1 à 3 feuilles du blé, suite à des températures minimales de l'ordre de -8°C à -10°C, on peut constater des dégâts foliaires qui se manifestent par un rougissement puis par un dessèchement des feuilles à partir de leur extrémité. Des températures basses intervenant au moment de la méiose du grain de pollen peuvent engendrer des déficits de grains par épi (Giban, 2001). L'effet des hautes températures au semis se matérialise par une réduction de la longueur de la coléoptile, la plante ne peut pas s'ancrer en profondeur et devient très sensible aux effets du stress thermique (Kirby et *al.*, 1985 in Hargas, 2007). Des températures élevées supérieures à 28°C pendant la maturation du grain, peuvent expliquer le phénomène d'échaudage physiologique. Les symptômes sont plus importants lorsque l'élévation de température est brutale et que cette température reste élevée longtemps (Giban, 2001).

### **I.2.3. Importance de la culture du blé dur en méditerranée**

Tout au long de la dernière décennie, la production de blé dur de l'arc méditerranéen a représenté la moitié de la production mondiale (17 millions de tonnes sur un total de 35 millions de tonnes dans le monde en 2007). L'union européenne (principalement l'Italie, l'Espagne et la Grèce) est le plus grand producteur de blé dur avec une récolte annuelle moyenne de huit millions de tonnes métriques. Le Canada arrive en deuxième rang avec 4.6 millions de tonnes métrique par année, suivi de la Turquie et des Etats-Unis, avec 4 et 3.5 millions de tonnes métriques respectivement (CIC, 2000). Les quatre pays de l'Afrique du nord, soit l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et la Libye, forment le plus grand marché d'importation de blé dur du monde (Lennox, 2003).

### **I.2.4. Importance de la culture du blé dur en Algérie**

Le blé dur est l'aliment de base des régimes alimentaires algériens. Il est d'une importance stratégique dans la nutrition humaine et l'alimentation animale, de ce fait, il occupe une place privilégiée dans l'agriculture algérienne (Boulai, 2007).

Le blé dur est très riche en gluten, vue l'importance nutritionnelle élevée. Les semoules de graines de blé dur, sont la matière première utilisée en alimentation. La semoule issue du blé dur est également à l'origine de produits alimentaires très divers, et aliments traditionnels : couscous, pain, galette, pâtisserie (Feillet, 2000), frik et pâtes diverses, gâteaux traditionnels (Selmi, 2000).

L'Algérie est parmi les pays d'Afrique du Nord les plus grands consommateurs de blé dur au monde, avec un taux de consommation d'environ de 216 kg par habitant et par an. Cependant, bien que la culture de blé dur occupe près de 65% de la surface céréalière du pays, sa production ne couvre que 28% des besoins de pays (Annicchiarico, 2006; Weigand, 2011).

### **I.2.5. Stockage du blé en Algérie**

#### **I.2.5.1. Le stockage traditionnel**

Le paysan algérien, sur les Hauts plateaux, conserverait tant bien que mal, le produit de ses champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées dans un sol argileux généralement à un endroit surélevé ou proche de la ferme. C'est ce qu'on appelle <<El matmour>>. La capacité de ces lieux de stockage est variable. Elle est de l'ordre de quelques mètres cubes. C'est une technique ancienne peut être encore utilisée dans certains régions isolées. L'inconvénient majeur de cette méthode de stockage, c'est l'humidité trop élevée et les eaux d'infiltration qui favorisent le développement des moisissures et les phénomènes de fermentation bactérienne (Doumandji, 2003).

#### **I.2.5.2. Le stockage en sac**

Les grains sont conservés dans des sacs fabriqués en toile de jute. Les sacs entreposés dans divers locaux, dépôts ou hangars. En cas de traitement chimiques, cette toile de jute permet le passage des fumigants, pesticides très volatiles capable d'agir sur l'appareil respiratoire des insectes. Souvent ce type de stockage est passager dans les milieux où l'autoconsommation est forte (Doumandji, 2003).

### **I.2.5.3. Le stockage en vrac**

Il est difficile à conserver le blé en vrac, les silos souterrains sont une des plus importantes techniques destinées à conserver le grain dans un état aussi proche que possible de son état initial (Sigaut in Multon, 1982). Dans ce cas, les grains en tas sont laissés à l'air libre dans des hangars ouverts à charpente métallique alors les contaminations sont possibles (Doumandji, 2003).

### **I.2.5.4. Le stockage en silo**

De nos jours, les silos permettent de stocker plusieurs types de céréales en même temps : ils sont multi-produits (Duron, 1999). Ce sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal. Elles sont fermées à leur partie supérieure par un plancher sur lequel sont installés les appareils de remplissage des cellules. L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'air de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux. Il existe plusieurs types de silos : silos de ferme (500 à 10000 quintaux), silos coopératifs (10000 à 100000 quintaux) et silos portuaires (50000 quintaux) (Doumandji, 2003). Il existe aussi des silos de capacité de 175000 à 250000 tonnes. Toute livraison peut être suivie en temps réel et les relevés de poids délivrés peuvent être édités automatiquement (Duron, 1999).

## **I.3. Facteurs de détérioration des céréales**

### **I.3.1. Facteurs d'altération du blé**

#### **I.3.1.1. Altérations enzymatiques**

Les enzymes propres aux grains sont responsables aux altérations enzymatiques qui se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies (Multon, 1982). C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxygénase. Les amylases hydrolysent l'amidon en sucres fermentescibles. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation (Afnor, 1986).

#### **I.3.1.2. Altération d'origine mécanique ou physique**

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des cassures et favorisant les autres causes d'altération. L'utilisation des radiations telles que les rayons



gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (Afnor, 1986).

### **I.3.1.3 Altération d'origine biologique**

Un lot des grains stockés comporte inévitablement au moins deux entités vivantes : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) (Multon, 1982). La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique (Magan et *al.*, 2003). Les virus paraissent négligeables, et les lichens sont parmi les rares organismes vivants capables de supporter sans dommage une grande sécheresse : leurs teneurs en eau se situent entre 5 et 40%, contre 75 à 97% pour le reste du monde vivant (Multon, 1982).

#### **I.3.1.3.1. Les macro-organismes**

Divers petits vertébrés rongeurs (souris, rats et oiseaux) peuvent vivre aux dépens des stocks de grains mal protégés, dont ils peuvent consommer des quantités considérables (Multon, 1982). De plus ils peuvent jouer le rôle d'un vecteur de germes pathogènes provoquant des contaminations et des lésions physiques dans les tissus végétaux qui favorisent donc la pénétration des spores (Jouany et Yiannikouris, 2002). La présence de la plupart des arthropodes, et singulièrement d'acariens, est révélatrice de mauvaises conditions de conservation. Les acariens vivant sur les grains moisissus, récupèrent et transportent les spores de champignons sur leur corps, mais également dans leur tube digestif et leurs fèces. Beaucoup d'acariens consomment les moisissures, préférant d'ailleurs les espèces les plus abondantes (Molinie, 2005). Les insectes, endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration des moisissures à l'intérieur de la graine. Quelques insectes disséminent des espèces mycotoxigènes. Là où les insectes et les rongeurs sont contrôlés, les moisissures sont souvent la cause unique de la détérioration (Magan, 2003).

### I.3.1.3.2. Les micro-organismes

#### ➤ *les bactéries*

Les grains fraîchement récoltés constituent une niche écologique pour plusieurs types de bactéries. La population bactérienne est essentiellement constituée par des eubactéries qui renferment une très forte proportion d'entérobactéries, notamment de coliformes qui sont toujours abondantes sur les céréales (Withlow et Hagler, 2001).

#### ➤ *les levures*

Les populations de levures dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les genres rencontrés sont : *Saccharomyces*, *Candida*,...etc. Ces genres ne donnent généralement lieu qu'à de faibles niveaux de contaminations, ne dépassant que rarement quelques centaines de germes par gramme de grain. Au contraire, des quantités élevées de levures sont souvent le signe d'une humidité élevée (Bourgeois, 1996).

#### ➤ *les Moisissures*

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Ils sont ubiquitaires. Les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Les moisissures ou leurs spores sont presque toujours présentes au niveau du grain. Les spores ont besoin d'un milieu chaud et humide pour se développer et produire des hyphes. Les hyphes pénètrent dans le produit et le transforme partiellement en d'autres substances nécessaires à leur croissance (Hayma, 2004). On peut distinguer deux grands types de moisissures : Les moisissures utiles qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* en fromagerie et les moisissures nuisibles qui peuvent se développer sur différents substrats et entraîner une altération des qualités nutritionnelles et diététiques des produits (Filtenborg, 1996). Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits Agricoles (Cahagnier, 1998 ; Doyle, 1998 ; Meyer, 2004). La contamination par les moisissures est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes (Satish, 2010).

✓ **Moisissures des céréales**

Plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses ont été trouvées sur les grains de céréales comme contaminants extérieurs. Les graines sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre ( $A_w$ ), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany et Yiannikouris, 2002).

Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25%), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (Molinie, 2005).

Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes, connus sous le nom de moisissures de champ, de stockage et la flore intermédiaire (Magan et Lacey, 1988).

- Mycètes de champ

Les céréales sont contaminées par des espèces rassemblant les moisissures qui s'implantent sur le grain avant la récolte. La plupart de ces espèces appartenant notamment aux genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Trichoderma*, ...etc. Beaucoup de ces champignons sont fortement cellulotiques, provoquant certaines maladies telles que la fusariose provoquée par le *Fusarium* (Akinsanmi, 2004).

- Mycètes de stockage

Au cours du stockage en silo, se développe une flore composée de champignons moins cellulotiques et plus osmophiles, éliminant peu à peu les champignons du champ et provoquant une acidification du substrat ; ce sont essentiellement des *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*), des *Eurotiums* (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens*) et des *Penicilliums* (*P. cyclopium*, *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. stoloniferum*).

L'évolution de cette charge fongique s'est révélée proportionnelle à la teneur en eau et donc à l'activité de l'eau ( $A_w$ ) (Larpent, 1990).

- Flore intermédiaire

Une troisième catégorie de moisissures constitue la flore intermédiaire et regroupe des germes capables d'un développement limité, mais qui peuvent prédominer largement en conditions particulières, tels que ; *Cladosporium*, *Trichoderma* et surtout les mucorales comme *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* (Godon et Loisel, 1997).

**I.3.2. Effets néfastes des altérations**

Les grains de céréale forment un excellent milieu de culture pour les moisissures. Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, assurée par une infection des mycètes, des insectes et des acariens. Cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (Mills, 1990). L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de la valeur nutritive ainsi qu'à des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques (Olsson, 2000), et aussi aux modifications des propriétés rhéologiques du grain (Molinie, 2005). Certaines espèces fongiques sont responsables de mycoses et de réactions allergiques chez l'Homme et l'animal. Les effets les mieux connus sont ceux provoqués par *Aspergillus fumigatus* responsable d'aspergillose pulmonaire et de mammites chez les animaux (Bauer et Garies, 1987).

## CHAPITRE II. LES MALADIES FONGIQUES DES CEREALES EN ALGERIE

En absence de la plante-hôte, les champignons responsables des maladies du blé se conservent dans différents supports comme la semence, les débris et le sol. Généralement on distingue les maladies transmises par les semences et les maladies foliaires. Les maladies transmises par les semences sont particulièrement le charbon et la carie. Le degré d'infestation d'un champ par ces agents pathogènes est directement lié à l'état sanitaire de la semence. Les principales maladies foliaires du blé sont la septoriose, la rouille, la maladie de la tache bronzé ou helminthosporienne et l'oïdium malgré son apparition tardive. Toutes ces maladies sont à caractère explosif et peuvent se propager très rapidement sur les variétés sensibles (Ezzahiri, 2001).

Selon Aouali et Douici-Khalfi (2009), les maladies des céréales peuvent être regroupées selon les symptômes qu'elles induisent et les parties qu'elles affectent.

De ce fait, on distingue :

- Maladies causant des symptômes localisés sur feuillage.
- Maladies causant des pourritures racinaires.
- Maladies causant des symptômes sur les épis.

### II.1 Maladies sur feuillage

#### II.1.1. Les rouilles

##### II.1.1.1. Agent pathogène

Il existe divers types de rouille affectant le blé et l'orge. Les trois types de rouille qui affectent notamment le blé sont la rouille brune, la rouille noir et la rouille jaune (Amrani, 2013).

La rouille brune est la plus répandue dans sa distribution, alors que la rouille noir est la plus nuisible quand elle se développe. La rouille jaune est limitée au climat tempéré froid et aux zones d'altitude (Collot., 2008). les Rouilles sont essentiellement présentes au niveau des hauts plateaux et les plaines de la Mitidja selon les enquêtes menées par Sayoud, (1996). Leur identification est facile car l'agent fongique produit des pustules caractéristiques, formées essentiellement de spores qui sont facilement disséminées par le vent. Les agents pathogènes responsables des rouilles du blé sont : *Puccinia recondita* agent de la rouille brune, *Puccinia graminis* agent de la rouille noir et *Puccinia striiformis* agent responsable de la rouille jaune (Bouhache., 2004).

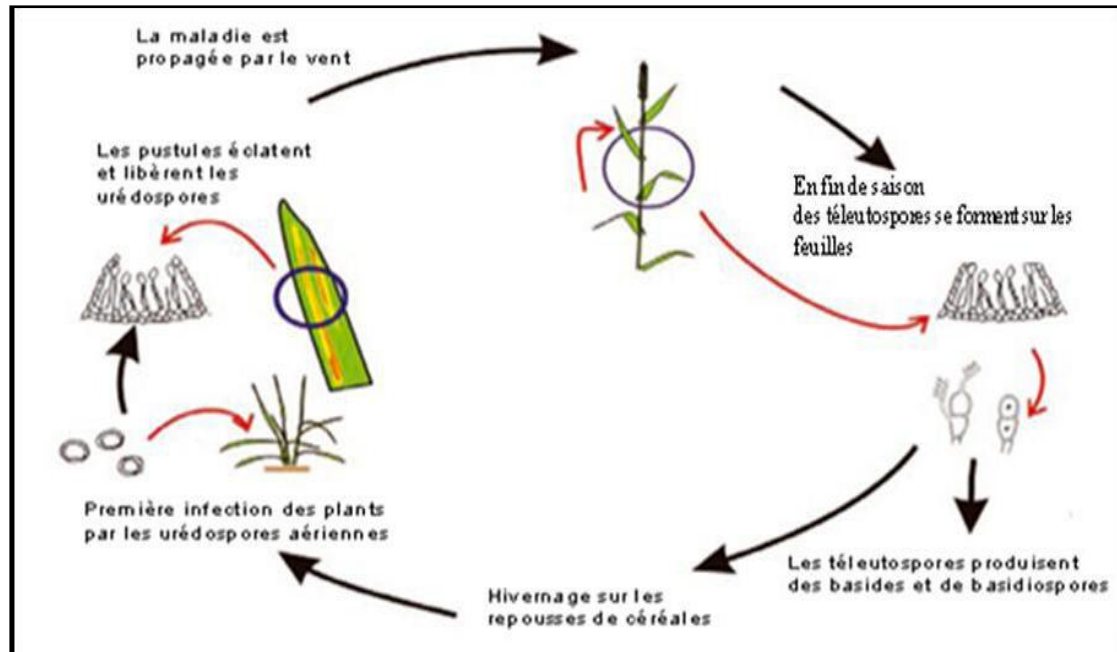
### **II.1.1.2. Symptômes**

Les pustules formées par les rouilles correspondent à une déchirure de l'épiderme et l'apparition d'une poudre (orange, brunâtre, rouge brique, marron foncé ou jaunâtre en fonction de l'espèce). Les symptômes spécifiques de chaque espèce de rouille sont les suivants :

- Pour la rouille brune : formation des pustules de petite taille, circulaires ou ovales, orange ou brunâtres. Elles apparaissent de préférence sur la face supérieure des feuilles.
- Concernent la rouille noir : elle forme des pustules plus longues que celles de la rouille brune et de couleur rouge brique à marron foncé.
- La rouille jaune : forme des pustules jaunâtres, alignées le long des nervures des feuilles, sous forme de stries. Les pustules se développent aussi sur la face inférieure des feuilles (Nasraoui, 2006).

### **II.1.1.3. Développement de la maladie**

Les cycles des rouilles sont complexes et impliquent souvent un hôte principal et un hôte alternatif, seule la rouille jaune ne connaît pas d'hôtes alternatifs. L'extension des épidémies des rouilles dépend de la nature et de la qualité de l'inoculum primaire, de la sensibilité de la variété cultivée, du stade de développement du blé au moment de l'infection primaire et des conditions climatiques. La rouille jaune est plus conditionnée par le milieu que les autres espèces de rouille, et nécessite des températures plus basses. En absence d'hôtes alternatifs, l'agent pathogène doit se conserver sous forme de cycles végétatifs (urédospores) (Figure 3) (Aouali et Douici-Khalfi, 2009).



**Figure 3:**Le cycle de développement des rouilles (BASF France Agro, 2015)

## II.1.2. Les septorioses

### II.1.2.1. Agent pathogène

Deux espèces de septoriose s'attaquent au blé, à savoir la tache septorienne et la septoriose des feuilles et des épis. Le pathogène *Septoria tritici*, agent de la septoriose des feuilles, connue sous le nom de la tache septorienne, et *Septoria nodorum* responsable de septoriose des feuilles et des épis. Les attaques sont notamment observées dans les zones humides. C'est surtout la septoriose des feuilles qui est la plus abondante sur les blés. Les pertes de rendement peuvent aller jusqu'à 40 % (Zahri, 2014).

### II.1.2.2. Symptômes

Les symptômes de *Septoria tritici* débutent par des petites taches brunes rougeâtre irrégulières sur les feuilles inférieures et en particulier sur celles en contact du sol. Les taches sont d'abord délimitées par les nervures pour ensuite s'étendre longitudinalement de 5 à 15 mm et prendre une couleur grise claire. Après l'apparition des nécroses sur les feuillages, on observe des ponctuations noires alignées parallèlement qu'on appelle pycnides (Ezzahiri, 2010).

### II.1.2.3. Développement de la maladie

Les chaumes du précédent cultural constituent l'origine de l'inoculum causale de la tache septorienne. Les pycnides du champignon peuvent survivre sur les chaumes du blé jusqu'à 6 mois et provoquent les premières infections sur les jeunes plantules de blé précisément sur les premières feuilles en contact du sol. En présence d'eau libre, les pycnides gonflent et produisent une gelée sporifère incolore qui protège les pycnidiospores en conditions défavorables. Après germination le champignon colonise le tissu foliaire. L'humidité est indispensable pour tous les stades de l'infection (Figure 4) (Huber, 2006).

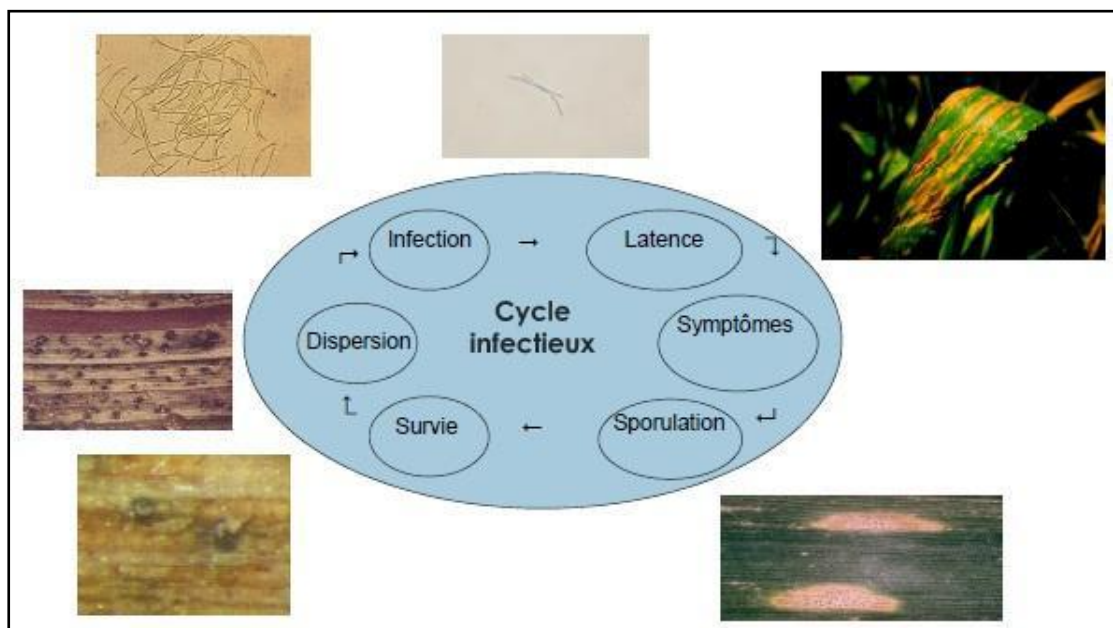


Figure 4: Le cycle de développement de la Septoriose (Legrève, 2012)

### II.1.3. Les helminthosporioses

#### II.1.3.1. Agent pathogène

La tache helminthosporienne ou la Tache auréolée est une grave maladie foliaire du blé, causée par le champignon *Pyrenophora tritici-repentis*. Elle est présente à travers les zones céréalières de l'Algérie. Elle est présente aussi bien sur le blé dur que sur le blé tendre selon les travaux de (Benslimane et al., 2006).

Les helminthosporioses sont largement répandues dans les zones de production des céréales et les attaques sont graves dans les régions à pluviométrie importante. En Algérie



cette maladie est sévère au niveau des zones littorales moyennes et les plaines intérieures, tandis que dans les hauts plateaux elle est relativement faible (Aouali et Douici-Khalfi, 2013).

### II.1.3.2. Symptômes

Les symptômes sont visibles au moment de la montaison jusqu'à la maturité. L'helminthosporiose progresse du bas vers le haut de la plante. Au niveau des feuilles, on trouve des taches ocellées en forme d'œil (ovoïde), souvent entourées d'un halo chlorotique jaune. Point noir au centre (c'est le point d'infection). Il est remplacé rapidement par un point foncé puis un cercle brun et absence de pycnide (Figure 5) (Masson, 2012). Ces symptômes peuvent être confondus avec ceux de *Septoria nodorum*. Cependant, la présence de petites nécroses de couleur brun foncé au centre des taches chlorotiques est un critère symptomatique des lésions de *Pyrenophora tritici-repentis* (Ruel, 2006).

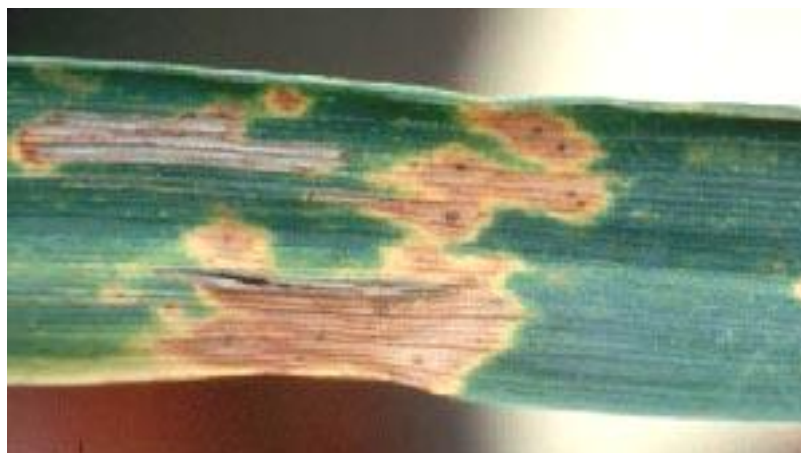


Figure 5 : Symptômes de l'helminthosporiose du blé (Ruel, 2006).

### II.1.3.3. Développement de la maladie

L'agent pathogène se conserve sous forme de spores et de mycélium sur les résidus du blé infecté à la surface du sol, alors que sur les chaumes, les périthèces et le mycélium constituent la principale source d'inoculum primaire. En présence d'humidité, les périthèces libèrent les ascospores et le mycélium produit des conidies. L'infection secondaire est assurée par la dissémination des conidies par le vent. La germination des spores et l'infection des tissus sont favorisées par des conditions humides et des températures optimales entre 18 et 28°C (Figure 6) (Ezzahiri, 2001).

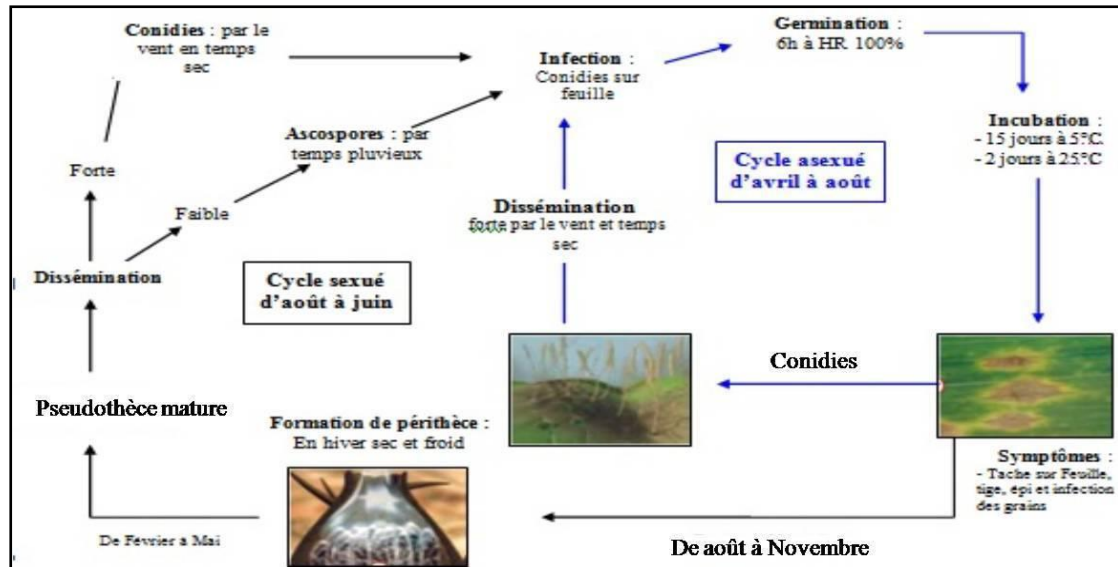


Figure 6: Cycle de développement de l'helminthosporiose du blé. (Devale, 2000 ; Verreet et klink, 2002).

## II.1.4. Oïdium

### II.1.4.1 Agent pathogène

L'Oïdium du blé causé par l'agent pathogène *Erysiphe graminis f.sp.tritici*, peut attaquer le blé sur toute la durée de la culture, sur feuille et sur épi. On le rencontre surtout sur variétés sensibles (Masson, 2012).

### II.1.4.2. Symptômes

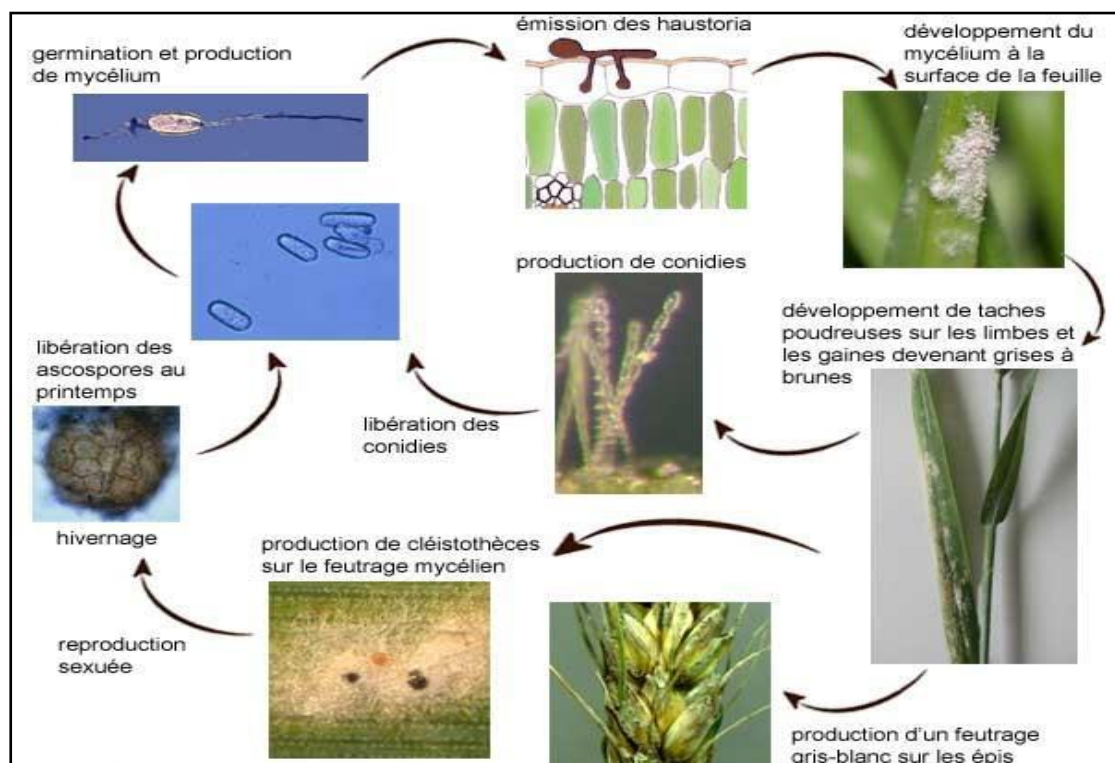
Les premiers symptômes d'*Erysiphe graminis f.sp.tritici* apparaissent sous forme d'un Duvet blanchâtre ou gris pâle sur les limbes des feuilles basales, puis se développent sur les feuilles de couches supérieures. En cas d'attaque sévère les taches apparaissent aussi sur les gaines des feuilles et les glumes des épis (Bégos, 2005).

### II.1.4.3. Développement de la maladie

L'infection de la plante par l'oïdium s'effectue par des conidies. Après la maladie est disséminée par l'air, les conidies s'installent sur l'organe de la plante hôte, germent et constituent un mycélium superficiel. En même temps, une courte hyphe fine se développe dans les cellules épidermiques et forme une haustorie avec laquelle le champignon absorbe les substances nutritives.

A partir du mycélium, les conidiophores se développent et libèrent de nouvelles conidies capables d'induire de nouvelles infections. Plus tard, la reproduction sexuée du

champignon aboutit à la production des cléistothèces contenant des ascospores à l'intérieur des asques. L'induction de l'infection primaire pendant la saison de végétation suivante est due au développement du mycélium en conservation ou à la germination des ascospores libérées à partir des asques qui sont déchargés à partir des cléistothèces (Figure 7) (Nasraoui, 2006).



**Figure 7:** Cycle de développement de l'agent pathogène : *Erysiphe graminis*.

(Chamant, 2013).

## II.2. Maladies des pourritures racinaires

### II.2.1. Agent pathogène

La pourriture racinaire ou la pourriture de pied ou encore la pourriture commune, sont des désignations décrivant une même maladie due à différents agents fongiques du genre *Fusarium* (*Fusarium culmorum* ; *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*) et *cochliobolus* (*Cochliobolus sativus*). L'importance des dégâts est extrêmement liée au type de culture, à la région et surtout aux conditions climatiques (El hadj Hammiche, 2013).

Cette maladie apparaît plus particulièrement dans les zones semi aride et pendant les années à faible pluviométrie.

## **II.2.2. Symptômes**

Les symptômes de cette maladie se caractérisent par un manque à la levée, fonte des Semis, lésion au niveau de la coléoptile, racines peu ou pas développées, déformation du germe, dessèchement brutal des jeunes plantes ; le symptôme le plus couramment observé est la coloration brune foncée des nœuds inférieurs ; sur les plantes âgées. Une infection par la fusariose peut créer une vraie pourriture du pied, ou la base de la tige devient brune et pourrie, ce qui entraîne l'émergence d'épis blancs, ce symptôme est très observé dans les saisons très sèches (El hadj Hammiche, 2013).

## **II.2.3. Développement de la maladie**

La relation entre les champignons responsables des pourritures racinaires avec les racines du blé est fatale. Ce sont des champignons qui sont perpétuellement présents dans le sol. Ils infectent les racines du blé quand les conditions sont favorables. Les principaux facteurs prédisposant à l'attaque de ces champignons sont le stress hydrique et des températures élevées (Ezzahiri, 2001).

## **II.3. Maladies sur épi**

### **II.3.1. Charbon nu du blé**

#### **II.3.1.1. Agent pathogène**

Le charbon nu causé par *Ustilago tritici* se développe aussi bien sur blé tendre que sur blé dur. Les attaques du blé par ce champignon sont observées de temps en temps (Majumder, 2013).

#### **II.3.1.2. Symptômes**

Les symptômes du charbon sont visibles entre la floraison et la maturité. Les épis infectés sont noircis, et apparaissent rapidement avant les épis sains. Les enveloppes de la graine, ainsi que leur contenu sont détruites et renouvelés par une masse noirâtre, constituée de spores du champignon (Ezzahiri, 2001).



**Figure 8** : Charbon nu sur épi du blé (Bayer-agri 2018, [www.bayer-agri.fr](http://www.bayer-agri.fr))

### **II.3.1.3. Développement de la maladie**

L'origine de l'infection du blé par le charbon se trouve dans la semence. L'agent responsable du charbon nu se conserve dans l'embryon du grain sous forme de mycélium dormant. Au moment de la germination de la semence, le mycélium est activé. Le champignon pathogène affecte la jeune plantule du blé et poursuit son développement au niveau de l'apex. Au moment de l'épiaison, tout le tissu de l'épi, sauf le rachis, est transformé en une masse sporifère. Les spores produites sont disséminées et infectent les fleurs des plantes voisines. Les conditions favorables à l'infection correspondent à une température de 16 à 22°C (Ezzahiri, 2001).

### **II.3.2. Carie du blé**

#### **II.3.2.1. Agent pathogène**

La carie commune du blé est causée par le champignon *Tilletia caries*, ou dans une moindre mesure par *Tilletia foetida* (Boulif, 2011). La contamination s'effectue lors de la germination du blé ; cependant, les symptômes ne sont visibles que plus tardivement.

#### **II.3.2.2. Symptômes**

Les symptômes de cette maladie n'apparaissent qu'au moment du remplissage des grains, sous forme d'une poussière noire à la place de l'amidon, associée à une odeur désagréable.

(Champion, 1997 ; Ezzahiri, 2001; Boulif, 2011). Les dommages de carie du blé peuvent atteindre 40% de perte de rendement ainsi qu'un parasitisme estimé à 80% en fonction des conditions climatiques (Nagy, 2007) (Figure 9).



**Figure 9** : épi et grains de blé caries source : (ARVALIS - Institut du végétal 2018, <http://www.fiches.arvalis-infos.fr>)

### **II.3.2.3. Développement de la maladie**

L'agent responsable de la carie se conserve sous forme de téléospores sur la semence et dans le sol. L'infection des jeunes plantes du blé se fait à des températures de 5 à 15°C. Le mycélium du champignon colonise le tissu méristématique et progresse vers l'épi, au fur et à mesure que la plante se développe (Ezzahiri, 2001).

## **II.4. Lutte contre les maladies cryptogamiques**

La lutte contre les maladies cryptogamiques est nécessaire pour obtenir une récolte abondante et de qualité. Elle peut être systématique (traitement chaque année à titre préventif) mais elle peut également être raisonnée (traitement lorsque cela s'avère indispensable) (Belahcene., 2008). Il existe plusieurs méthodes de lutte contre les maladies cryptogamiques

### **II.4.1. La Lutte biologique**

La lutte biologique se base sur l'utilisation d'organismes vivants pour réduire la population des agents pathogènes de manière à diminuer les dégâts dans les cultures.

Champignons, Nématodes, Bactéries, Insectes. Tous ces organismes sont potentiellement des prédateurs pour les parasites et les ravageurs (Brodeur, 2007).

#### **II.4.2. La Lutte culturale**

La lutte culturale peut réduire l'incidence et la gravité des maladies. Les rotations utilisant des espèces différentes du blé et non hôte des maladies ainsi que les assainissements réalisés par des labours profonds des débris végétaux peuvent réduire la quantité d'inoculum disponible (Bensadoun, 2010).

#### **II.4.3. La Lutte génétique**

La résistance variétale quand elle existe, elle reste la méthode de lutte la plus rentable et la plus efficace contre les maladies foliaires du blé. La résistance n'est pas un caractère stable étant donné qu'elle peut être surmontée par de nouvelles races et souches des agents pathogènes concernée (Ezzahiri, 2001). C'est la solution idéale car elle dispense l'agriculteur des couts qu'il aurait à engager dans la lutte tout en préservant l'environnement (Harrat, 2009).

#### **II.4.4. La Lutte chimique**

La lutte chimique a pour but d'éviter la maladie (traitement préventif) ou de stopper (traitement curatif), elle doit être raisonnée en tenant compte de la durée de traitement, du produit utilisé, de la dose à appliquer, du spectre d'action de la matière active. Pour une meilleur efficacité des traitements, l'agriculteur doit choisir la bonne période pour cela et doit tenir compte aussi :

-De l'humidité de l'air (il est important qu'il ne pleuve pas dans les premiers jours suivant le traitement).

-De l'état du sol (le sol ne doit pas être trop humide).

La lutte chimique contre les agents phytopathogènes concerne particulièrement les champignons responsables des maladies fongiques des plantes. En agriculture, les fongicides sont utilisés pour abattre les champignons pathogènes qui s'attaquent aux cultures, aux semences et aux produits récoltés. Les molécules et les préparations fongicides utilisées dans la pratique agricole sont extrêmement nombreuses et appartiennent à des familles chimiques variées (Bermond, 2002).

## CHAPITRE III. LES FONGICIDES

### III.1. Définition

Le premier utilisateur de fongicides dans le monde est l'Europe occidentale. Les fongicides sont connus comme étant des destructeurs de divers champignons pathogènes s'attaquant aux cultures de céréales à petits grains. (Who, 2005).

Les fongicides sont selon Clément, (1981), des substances (matières actives) ou préparations susceptibles d'entraîner plus ou moins rapidement l'inhibition de la croissance ou la mort des champignons et d'être pratiqués pour la lutte contre les maladies cryptogamiques des cultures et des produits récoltés. Aujourd'hui, les traitements fongicides offrent aux utilisateurs une gamme variée de produits ainsi que de nouvelles substances actives qui présentent une protection prolongée, un large spectre d'activité et un contrôle systémique des maladies (Calvet, 2005).

### III.2. Différentes familles de fongicides

Une fois appliqué sur une plante ou dans le sol, les fongicides restent à la surface de la plante ou pénètrent dans la plante. On peut donc tout de suite distinguer deux grands groupes :

#### III.2.1. Les fongicides de contact (surface) qui ne sont pas absorbés par la plante

Lorsqu'un fongicide de surface est appliqué, les gouttelettes s'étendent sur la feuille mais ne pénètrent pas dans la feuille. Les feuilles qui émergent après l'application ne sont donc pas protégées et le fongicide est lessivé par la pluie et parfois désactivé par le soleil (Carisse, 2008) (Figure10).

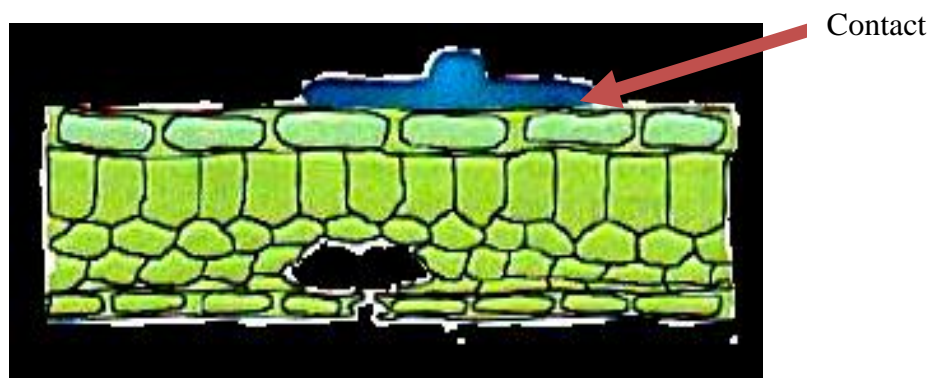


Figure 10 : Action du fongicide par contact (Couvreur, 2002).



### III.2.2. Les fongicides systémiques

#### III.2.2.1. Définitions de la systémie

La systémie est l'aptitude d'une molécule à se déplacer dans la plante pour atteindre sa cible. Autrement dit, un composé est dit systémique lorsqu'il est retrouvé dans la plante (Rocher, 2004). Selon Simon *et al.* (1994) les fongicides systémiques pénètrent dans la plante et agissent, après leur transport par la sève. Ils sont généralement appliqués sur le feuillage, mais peuvent également être appliqués dans le sol. Lorsque le fongicide est absorbé par la plante, il se déplace vers le haut (apex) et le bas (racine) de la plante avec la sève montante et descendante. Les feuilles qui émergent après l'application sont donc protégées et le fongicide ne peut pas être lessivé par la pluie (Figure 11) (Carisse, 2008).

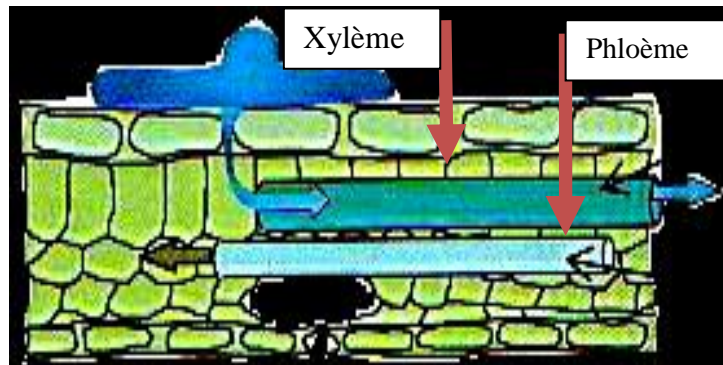


Figure 11: Action systémique du fongicide (Couvreur, 2002).

#### III.2.2.2. Principaux fongicides systémiques

##### III.2.2.2.1. Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS)

Il s'agit d'une importante classe de fongicides qui est développée depuis 1973. Ces inhibiteurs peuvent provoquer l'apparition de résistance chez les champignons pathogènes, en particulier si leur utilisation est excessive. La plus grande famille chimique de fongicides IBS est celle des azolés. Ces molécules sont en majeure partie systémiques. Trois d'entre elles sont toutefois des fongicides de contact : le prochloraz (imidazole), le bitertanol et le difénocanazole (triazoles) (Rocher, 2004).

### III.3. Mode d'action et site d'activité

Selon Simon *et al.* (1994), on distingue deux types de fongicides selon leur site d'action ; les fongicides à site unique (les unisites) et ceux à site multiple (les multisites) :

### **III.3.1. Les fongicides à site multiple (les multisites)**

Ces composés inhibent simultanément plusieurs fonctions essentielles du champignon ; ils n'ont pas de cible enzymatique spécifique. De ce fait, on n'observe pas ou très peu de résistance de champignons vis-à-vis de ces molécules (Leroux, 2003). Les produits multi-sites sont utilisés soit en pulvérisation sur le feuillage des cultures, soit en traitement des semences. Ils inhibent plus particulièrement la germination des spores. Du fait de leur faible rémanence, leur application doit être régulièrement renouvelée.

### **III.3.2. Les fongicides à site unique (Uni sites)**

Agissent contre un point précis et bien déterminé. C'est le site primaire, à partir de là, une réaction en chaîne peu s'enclencher entraînant de nombreuses perturbations du métabolisme. Ces fongicides sont connus sous le nom d'agent spécifique (Exp. : les triazoles, les strobilurines).

#### **III.3.2.1 Les triazoles**

Les triazoles sont caractérisés par un hétérocycle à 5 atomes dont 2 carbones et 3 azotes. Ils font partie d'un groupe de molécules fongicides appelé IDM (inhibiteurs de la déméthylation), qui regroupe notamment le cyproconazole, l'époxiconazole et le prothioconazole. Utilisés en agriculture depuis une bonne trentaine d'années, Ils bénéficient d'un large spectre d'efficacité contre les maladies des céréales (Walker, 2008 ; Görtz, 2008).

##### **III.3.2.1.1 Mode d'action**

Les triazoles ont une action à la fois préventive et dans une certaine mesure curative. Leur fonctionnement est spécifique : ils bloquent chez le champignon la synthèse des stérols, et plus précisément de l'ergostérol, en inhibant l'activité de la « 14- $\alpha$  déméthylase ». Encore plus précisément, ils bloquent le site actif de cet enzyme qui est également un cytochrome P450 codé par le gène (*cyp51*) (Vandeputte, 2008 ; Walker, 2008).

## **III.4 Les fongicides triazolés utilisés en agriculture Algérienne**

### **III.4.1 Raxil® 060 FS**

C'est un fongicide systémique liquide (suspension fluide) appliqué comme un traitement de semences des céréales notamment le blé contre les maladies du charbon et

de la carie (*Tilletia caries*, *Urocystis spp* et *Ustilago spp.*) et contre les *Septoria nodorum* transmises par les semences.

#### III.4.1.1. Compositions et dose d'utilisation

Le Raxil® 060 FS contient 60 g / l de tébuconazole (Figure12). La dose d'utilisation préconisée est de 0.5l/ha.

#### III.4.1.2. Mode d'action

Le Raxil® contrôle les pathogènes présents dans les semences ainsi que ceux adhérant à sa surface externe. Il est composé de Tébuconazole et possède d'excellentes propriétés systémiques. Après sa pénétration à travers les téguments. Il est véhiculé dans la graine et la jeune tige. Son large spectre d'action couvre les principales maladies des semences. Le tébuconazole agit comme un inhibiteur de déméthylation (IDM) de la biosynthèse des stérols fongiques.

#### III.4.1.3. Périodes d'utilisation

Le Raxil® 060 FS utilisé pour le traitement des semences avant la plantation. Les graines doivent être sèches et exemptes de dépôts de sol au traitement.

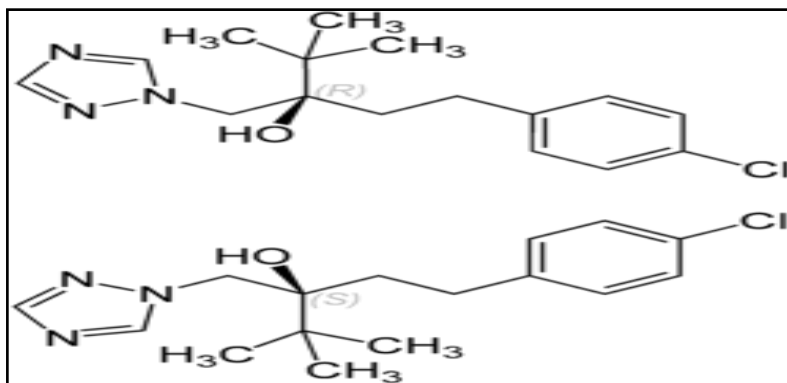


Figure12 : Structure chimique du tébuconazole (Couvreur, 2002)

#### III.4.2 Artea® 330EC (concentré émulsionnable)

C'est un fongicide foliaire systémique à large spectre. Il est efficace contre les principales maladies cryptogamiques des céréales (l'oïdium, la septoriose, les rouilles et les maladies de la tache de la feuille) et protège les cultures même en temps pluvieux (Carter, 1987).

### III.4.2.1. Compositions et dose d'utilisation

Le fongicide est présenté sous forme liquide de couleur jaunâtre à marron clair. Sa matière active est composée de :

-80 g/l de cyproconazole.

-250 g/l de propiconazole.

La structure chimique de ces deux molécules est représentée dans les Figures 13 et 14. La dose d'utilisation de l'Artea® 330 EC est de 0.3 à 0.5l/ha.

### III.4.2.2. Mode d'action

L'ingrédient actif est absorbé par les feuilles et les tiges et est transporté vers le haut de la plante et dans les zones de croissance. Il agit de manière systémique, préventive et curative. Sa longue durée d'action assure à la culture une protection de 3 à 5 semaines. (Carter, 1987).

### III.4.2.3. Périodes d'utilisation

L'application de l'Artea® 330 EC est flexible durant tous les stades de croissance des céréales pour assurer une protection des parties non traitées de la plante ainsi qu'une meilleure qualité et productivité.

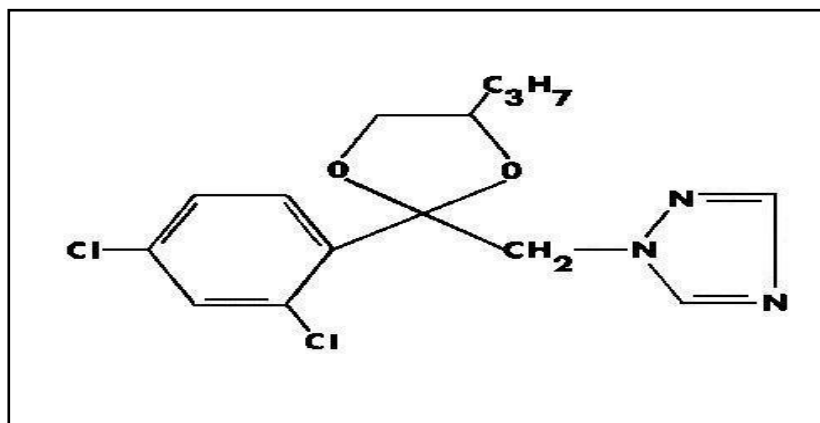


Figure13 : Structure chimique du Propiconazole (Anonyme., 2000)

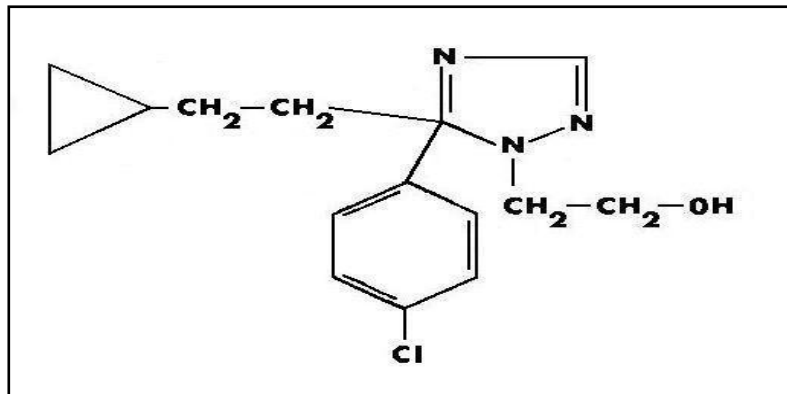


Figure14 : Structure chimique du Cyproconazole (Hennouni, 2012).

### III.4.3. Amistar®Xtra

C'est un fongicide liquide avec des propriétés systémiques, translaminaires et de contact à large spectre d'efficacité pour toutes les stratégies possibles. Il est préconisé Contre toutes les maladies importantes sur feuilles et épis dans les céréales.

#### III.4.3.1. Compositions et dose d'utilisation

Le fongicide est présenté sous forme liquide de couleur blanchâtre. Sa matière active est composée de :

- 200 g/l d'azoxystrobine
- 80 g/l de cyproconazole.

Donc, la structure chimique de l'azoxystrobine est observée par la Figure 15.

La dose d'utilisation de l'Amistar®Xtra est de 0.5 à 0.75l/ha.

#### III.4.3.2. Mode d'action

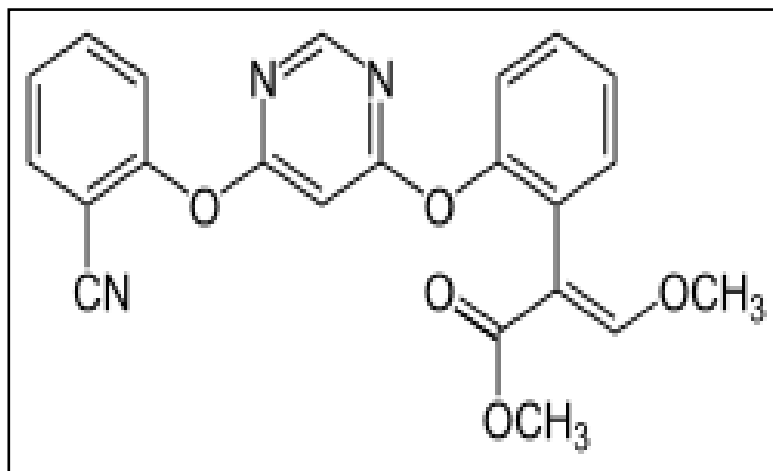
La combinaison de deux matières actives offre à l'Amistar®Xtra deux modes d'action différents.

- L'Azoxystrobine, matière active de la famille des strobilurines : elle a une action translaminaire et agit au niveau de la mitochondrie par le blocage de la respiration des champignons pathogènes.
- Le Cyproconazole, matière active de la famille des triazoles : elle a une action systémique et agit par inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol des champignons

pathogènes. Amistar®Xtra est, à la fois préventif en bloquant la germination des spores et curatif en empêchant la croissance mycélienne et la sporulation. L'action simultanée des deux matières actives composant l'Amistar®Xtra lui confère une excellente efficacité contre les maladies fongiques des céréales (fiche technique [www.syngenta.fr](http://www.syngenta.fr)).

### III.4.3.3. Périodes d'utilisation

Le Meilleur stade d'application de l'Amistar®Xtra est DC 39-5 (montaison-épiaison) (fiche technique [www.syngenta.fr](http://www.syngenta.fr))



**Figure 15** : structure chimique de l'azoxystrobine (Ineris, 2012)

## **CHAPITRE IV. LA RESISTANCE AUX FONGICIDES TRIAZOLEES**

### **IV.1 Définition**

La résistance à un fongicide est souvent déterminée par une modification du patrimoine génétique (porté par l'ADN) du champignon, qui entraîne une modification de la cible. Le champignon devient ainsi moins sensible à l'action du fongicide. Il existe deux types de résistance : la résistance naturelle et la résistance acquise, pour laquelle les populations majoritairement sensibles au moment de l'introduction d'une famille chimique, sont devenues résistantes sous la pression d'utilisation de ces fongicides (Walker, 2008).

### **IV.2. Mécanismes de résistance aux triazolés**

Trois principaux mécanismes de résistance aux azolés sont décrits : des modifications de la cible, la surexpression de la cible et la surexpression de pompes d'efflux multidrogues.

#### **IV.2.1. Modification de la cible**

La cible principale des azolés est la 14- $\alpha$ -déméthylase qui intervient dans la synthèse de l'ergostérol et est synthétisée par le gène (*CYP51*). Plusieurs mécanismes modifiant la qualité et/ou la quantité de cette enzyme cible sont à l'origine de résistance des mycètes vis-à-vis des azolés. Des mutations non-synonymes (ponctuelles) dans *CYP51A* chez les filamenteux diminuent l'affinité de l'azolé pour sa cible. Seules des mutations en des positions déterminées entraînent une résistance. Bien que la cible soit modifiée, la résistance n'est pas obligatoirement croisée pour l'ensemble des azolés (Rocher, 2004).

#### **IV.2.2. Surexpression de la cible**

La surexpression de la 14- $\alpha$ -déméthylase est un mécanisme de résistance aux azolés traduit par la présence en grande quantité d'ergostérol dans les membranes plasmiques est secondaire ce qui entraîne l'augmentation de la transcription de *CYP51* ou sa duplication. La résistance serait croisée entre tous les azolés. (Guillot, et Dannaoui, 2015).

#### **IV.2.3. Systèmes d'efflux : efflux accru (MDR)**

La résistance aux azolés est aussi liée à l'activité accrue de pompes à efflux qui conduit à une rapide élimination des antifongiques. Les pompes impliquées dans la résistance aux azolés appartiennent à deux familles , la famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassettes*) et la famille des transporteurs MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (Dannaoui, 2012 ; Perlin, 2014).

La surexpression de pompes membranaires d'efflux réduisent rapidement la concentration d'antifongiques dans la cellule fongique (Cuenca-Estrella, 2014).



## CHAPITRE I: ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES

Dans le but de mettre en évidence la mycoflore associée à des semences, feuilles et épis de blé dur traitées et non traitées par des fongicides triazolés. Une étude est effectuée durant les saisons agricoles (2013-2014) et (2014 – 2015). Il est à noter que l'étude a été menée conjointement au sein des laboratoires de Mycologie Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (Université des Frères Mentouri- Constantine1, Algérie), de Parasitologie et Mycologie Médicale (Université Claude Bernard-Lyon 1, France) et celui de Parasitologie et Mycologie, CHU La Timone Marseille, France.

### I.1. Matériel végétal

Pour les deux campagnes, notre étude a porté sur la variété GTA de blé dur (*Triticum durum*). C'est la variété de blé dur la plus précoce. Elle est d'origine mexicaine et a été introduite en Algérie par l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures). Elle est de paille courte (moins de 90 cm). Elle présente de bonnes caractéristiques technologiques, et particulièrement dans la fabrication du pain et des pâtes (Hamadache, 2001).

#### I.1.1. Prélèvement des échantillons

##### I.1.1.1. Semences de blé non traité

Pour chaque saison, 1 kg de chaque échantillon de semences de blé dur non traité a été récupéré chez deux agriculteurs libéraux l'un situé à Teteghma Wilaya de Mila (38km de Constantine) et l'autre situé à El Hamma (17,2 km de Constantine). Les semences de blé dur sont stockées dans des sacs fabriqués en toile de jute, dans des hangars à l'abri de l'humidité. Les échantillons ont été ramenés dans des sacs du papier stériles afin de les traiter au Laboratoire de Biotechnologie, Mycologie et de l'Activité Microbienne.

##### I.1.1.2. Semences de blé traité

Pour chaque saison, 1 kg d'échantillon de semences de blé dur traité par le fongicide Raxil® 060 FS ont été tirées au hasard directement des silos de stockage à l'OAIC (Office Algérien Interprofessionnel des Céréales) à l'aide d'une spatule stérile. Les échantillons ont été conservés dans des sacs stériles et traités au Laboratoire de Biotechnologie, Mycologie et de l'Activité Microbienne.

### **I.1.1.3 Feuilles et épis de blé au stade fin tallage-début montaison (1<sup>er</sup> traitement au champ)**

Pour chaque saison, des échantillons de feuilles et épis de blé ont été récupérés au hasard directement des champs de blé (chez les deux agriculteurs) avant et après traitement par le fongicide Amistar®Xtra à l'aide de ciseaux stérile. Les échantillons ont été conservés (24h à 4°C) dans des sacs stériles et traités au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (UFMC1).

### **I.1.1.4 Feuilles et épis de blé au stade floraison (2<sup>ème</sup> traitement au champ)**

Des échantillons des Feuilles et épis de blé ont été récupérés au hasard directement des champs de blé avant et après leur traitement par le fongicide Artea®330EC. Les échantillons ont été conservés dans les mêmes conditions citées précédemment et traités au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne.

## **I.2. Isolement des champignons phytopathogènes**

### **I.2.1. Milieux d'isolement**

#### **I.2.1.1. Semence de blé dur**

Quatre milieux (Annexe 1) ont été utilisés pour l'isolement des champignons des semences de blé traités et non traités.

- PDAac (Potato dextrose agar acidifié)
- PDAr (Potato dextrose agar rose Bengal)
- Gzapeck acidifié
- Gzapeck rose Bengal

L'ajout de l'acide lactique ou du rose Bengal empêche le développement des bactéries. De plus le rose Bengal ralentit le développement des moisissures à croissance rapide et permet d'isoler les moisissures à croissance lente (Larpent, 1990).

#### **I.2.1.2. Feuilles et épis de blé dur**

Le milieu PDAac (potato dextrose agar acidifié) a été utilisé pour l'isolement des champignons phytopathogènes à partir des feuilles et de l'épi de blé dur.

## **I.2.2. Méthodes d'isolement**

### **I.2.2.1. Semence de blé dur**

Deux méthodes ont été utilisées pour isoler la mycoflore des échantillons des semences de blé dur considérés : une méthode directe et une autre indirecte afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de la mycoflore isolée, en rapport avec la technique utilisée.

#### **I.2.1.1. Méthode de suspension-dilution (méthode indirecte)**

La technique d'isolement indirect utilisée est celle décrite par Multon (1982). 5g de grains de chaque échantillon sont désinfectés et sont additionnés à 45ml d'eau physiologique stérile ainsi que quelques gouttes de Tween 80 (solution mère). Ensuite, une série de dilutions est réalisée jusqu'à l'obtention de la concentration désirée. Des boîtes de Pétri contenant les milieux : PDAac, PDAr, Gzapeck acidifié, et Gzapeck rose Bengal sont ensemencées avec 1ml des dilutions, le surnageant est éliminé après 10 à 15mn. Toutes ces analyses ont été réalisées en triplicata pour chaque échantillon. L'incubation dure 5 à 7j à 28°C.

#### **I.2.1.2. Méthode du papier buvard (méthode directe)**

L'isolement a été effectué selon la méthode proposée par Mills *et al*, (1978) avec quelques modifications. 60 grains de blé désinfectés et sélectionnés au hasard, à partir de chaque échantillon, ont été mis dans 4 boîtes de Pétri stériles contenant du papier filtre stérile, imbibé avec 5.5 ml d'une solution aqueuse stérile de chlorure de sodium à 7.5%. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 25°C dans l'obscurité pendant 10 à 15 jours. Toutes ces analyses ont été réalisées en triplicata pour chaque échantillon (Tahani *et al*, 2008).

### **I.2.2.2. Feuilles et épis de blé dur**

Pour isoler la mycoflore des feuilles et épis considérés, nous avons utilisé la technique directe pour l'isolement à partir des feuilles et de l'épi et la technique de la chambre humide pour l'isolement à partir des feuilles.

#### **I.2.2.2.1. Technique directe**

Des fragments de feuilles ont été stérilisés pendant 3 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1%, rincés avec de l'eau distillée stérile et séchés sur un papier buvard stérile. 4 à 6 morceaux de 5mm des feuilles ont été déposés dans des

boîtes de Pétri contenant le milieu PDAac l'incubation dure 5 à 7j à 28<sup>0</sup>C (Belkacem-Hanfi *et al*, 2013).

#### **I.2.2.2.2 Technique de la chambre humide**

En ce qui concerne la technique de la chambre humide, la méthode d'isolement consiste à préparer les fragments de feuilles : stériliser pendant 3 minutes les fragments de feuilles avec une solution d'hypochlorite de sodium à 1% puis les rincer avec de l'eau distillée et les faire sécher sur un papier buvard stérile. Ensuite, fixer avec du scotch chaque morceau de feuille sur une lame en verre que l'on met dans une boîte de Pétri contenant du papier buvard stérile imbibé d'eau distillée stérile (chambre humide) (Jebbouj et Brahim-El Yousfi, 2006).

Exposer les boîtes de Pétri, bien fermées, à la lumière pendant 12 à 24 heures, le temps nécessaire pour la sortie des conidiophores, puis elles sont mises dans l'obscurité totale pendant 12 à 24 heures pour l'apparition des conidies. Les boîtes de Pétri sont observées à l'aide d'une loupe binoculaire. Les fragments de feuilles sont ensuite déposés sur le milieu PDAac (3boîtes pour chaque échantillon de feuille de blé dur) et l'incubation est réalisée à une température de 25°C pour une période de 6 à 7 jours (Semale, 1993). Toutes les manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous hotte avec l'appoint d'un bec Bunsen. Les colonies développées autour des fragments de végétal n'étant pas pures, elles sont dans la majorité des cas contaminées (Semale, 1993).

#### **I.2.3 Purification et conservation des souches isolées**

Des observations quotidiennes sont effectuées dès la germination des grains et l'apparition de mycélium. Chaque mycélium développé est repiqué, à l'aide d'un fil de platine stérile, au centre de boîte de Pétri contenant un milieu PDAac neuf puis incubé à 27°C pendant 6 jours. En cas de contamination par autre souche fongique, la purification des souches est effectuée par le repiquage d'un hyphe terminal au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (Guiraud, 2003).

Les souches pures obtenues sont conservées dans des micro-tubes à cryobilles au congélateur à -20 °C.

### **I.3. Méthodes d'identification**

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturels (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

#### **I.3.1. Identification morphologique**

##### **I.3.1.1. Identification macroscopique**

L'évaluation de l'ampleur de la croissance et du développement est observée après 5,7 et 10 jours d'incubation à 28°C. Ce suivi réalisable à l'œil nu mais aussi grâce à un binoculaire permettant ainsi de rassembler des indices révélateurs de l'identité de nos souches (couleur du mycélium aérien et sa variation au cours du temps, couleur du revers de la boîte...).

##### **I.3.1.2. Identification microscopique**

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait par la technique de scotch qui consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Chabasse, 2002). 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). L'observation microscopique de moisissures repose sur des caractéristiques tels que: hyphes cloisonnés ou non, type et apparence du système sporale, caractéristiques de la spore asexuée (couleur, taille, septation), etc... (Guiraud, 2003).

#### **I.3.2. Caractérisation moléculaire des isolats**

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturelles et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en générale, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer

des méthodes d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006 ; Hinrikson, 2005 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin *et al.*, 2004 ; Reiss *et al.*, 1998).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 18S ribosomale et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson, 2005).

L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. L'identification moléculaire peut permettre une différenciation rapide des différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que celle d'autres moisissures ou levures, pathogènes opportunistes (Dial, 2007 ; de Aguire, 2004 ; Schabereiter-Gurtner, 2007 ; Paterson, 2003) Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (Boysen, 2000 ; Hageskal, 2006).

### **I.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique**

Les isolats des mycètes ont été réensemencés sur milieu nutritif SDA (Sabouraud Dextrose Agar) et placés en chambre de croissance pendant 7 jours à 28°C. L'extraction de l'ADN a été réalisée au sein du laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale (Université Claude Bernard-Lyon1).en utilisant le Kit Quiagen.

Un volume de 200µl de surnageant a été prélevé de la culture puis passé au disrupteur (DisruptorGenie) à billes (0.5mm) pendant 20 min à vitesse max (2850 rpm) (le volume de bille 1 pour 2). Ensuite, 20 µl de protéase K ont été ajoutés aux 200µl de chaque échantillon pour dénaturer toutes les enzymes. La lyse de la paroi cellulosique des spores fongiques a été réalisée dans 200µl de tampon AL. La suspension a été vortexée jusqu'à dissolution complète du culot et incubée à 56°C pendant 10 min. Après incubation, 200 µl d'éthanol absolu ont été rajoutés afin de précipiter l'ADN. La suspension a été pipetée (y compris le précipité qui a pu se former) et transféré dans une colonne placée dans un tube de 2 ml (fourni dans le Kit), puis centrifugée 1mn à 6000 g. La colonne de cilice a été remise dans un nouveau tube de 2ml, ensuite elle a été lavée avec 500 µl de Tampon AW1 puis centrifugée 1min à 6000g. La colonne a été remise une deuxième fois dans un nouveau tube de 2ml et a été lavée avec 500 µl de AW2 et centrifugée 3 min à 10.000g, par la suite la colonne a été placée dans un tube Eppendorf 1.5ml et éluée avec 50 µl d'eau pur préchauffée à 60°C. Une incubation d'une heure a été faite avant une centrifugation

d'une minute à 6000g. 50 µl de la solution ont été récupérés et 5 µl ont été utilisés pour l'amplification de l'ADN.

### **I.3.2. 2. Amplification de l'ADN fongique (PCR Panfongique)**

Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le genre ribosomal 18s, très représenté dans les banques de données. Ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences avec celles d'organismes connus. Deux amorces universelles ont été utilisées : ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). L'amplification est réalisée par un volume de 20 µl. Les réactions de PCR ont eu lieu dans le thermocycleur (LightCycler 1.5 Roche). Les micros tubes contiennent 2 µl de l'ADN dans un mélange réactionnel de 20 µl.

Les conditions d'amplification par PCR ont été : une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 Minutes suivie de 45 cycles de dénaturation à 95°C (10 secondes), Hybridation à 58°C (10 secondes) et élongation à 72°C (40 secondes).

### **I.3.2.3. Purification du produit PCR**

La purification des séquences a été réalisée avec le Kit CleanSeq (de la société Agencourt), une purification sur kit Billes magnétiques SPRI. (Le protocole est détaillé dans l'annexe 2).

### **I.3.2.4. Séquençage de l'ADN**

Les produits PCR purs sont séquencés au laboratoire Biofidal (Avenue Gabriel Péri 69120 Vaulx en Velin, Lyon France) selon la méthode de Sanger avec le Kit BigDyeTerminator V3.1 (société Lifetechnologies), en utilisant les amorces ITS1 et ITS4. Une réalisation d'un mélange réactionnel contenant de 0,5 à 1 µL d'Amorces (à 10 µM), 1 µl Ready Mix, 2 µl de dilution Buffer 5 X, 0,1 µl Taq (Termi Pol 5U/µl), 11 µl H<sub>2</sub>O. Pour l'ensemble des réactions, qui ont été reparti dans les puits de la plaque PCR où se trouve l'ADN déjà pur. La plaque a été scellée et placée dans le thermocycleur, 35 cycles ont été réalisés ; une dénaturation pendant 15s à 95°C, hybridation pendant 15 s à 51°C et élongation pendant 3 min à 60°C, refroidissement à 11°C, toutes ces étapes sont précédées par une dénaturation initiale pendant 3 min à 95°C.

### **I.3.2.5. Analyse des séquences**

Les résultats du séquençage des souches fongiques ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts sous logiciel Chromas. Les alignements du couple des séquences sens / antisens ont été effectués par le logiciel Clustal X pour définir la Séquence consensus.

### **I.3.2.6. Comparaison des séquences avec la banque informatique**

Les séquences d'ARNr 18s obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLASTn (Blast local Alignment Search Tool for nucléotides) sur le site NCBI (National Center For Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Altschul, 1997).

### **I.3.2.7. Analyse phylogénétique**

L'analyse phylogénétique consistait à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre des substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est fiable. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus.

### **I.3.2.8. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques**

Après avoir aligné les séquences, l'arbre phylogénétique a été construit avec le programme Mega version 6. Ce programme permet d'utiliser des méthodes mathématiques modélisant différentes hypothèses quant à l'évolution des gènes, et génère des arbres phylogénétiques représentant les relations entre organisme. La méthode utilisée pour la construction d'arbre est celle du « Neighbor Joining » (Saitou et Nei, 1987) : elle est la plus utilisée en microbiologie. C'est une méthode de distance, elle est basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences voisines qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode relativement rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Cependant elle n'est pas utilisable pour des séquences très éloignées, et elle traite toutes les substitutions de manière équivalente ce qui induit une perte d'informations comme dans toutes les méthodes de distance (Ex : UPGMA), la méthode



du Neighbor Joining sous estime le nombre d'événements mutationnels car les substitutions sont simplement dénombrées et ne sont pas pondérées. Or des phénomènes de mutations multiples peuvent se produire. Différentes corrections ont été proposées pour tenter de corriger ce biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases se sont substituées à un locus donné. La correction de Kimura (1980) repose sur l'hypothèse que les transitions se produisent à des taux élevés que les transversions : le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions. Par ailleurs, la robustesse des arbres a été testée par la méthode du bootstrap (Felsenstein, 1985). Cette méthode d'analyse par échantillonnage permet d'évaluer la robustesse de chaque embranchement en donnant une mesure statistique de la confiance qui peut lui être attribuée. L'échantillonnage consiste à redistribuer les sites de façon aléatoire et à créer les topologies de l'arbre correspondant. L'opération est réalisée 100 à 1000 fois. La valeur de bootstrap d'un embranchement correspond à sa fréquence d'obtention sur les différentes topologies obtenues.

### **I.3.3. Identification par MALDI-TOF MS**

L'identification des champignons filamenteux par MALDI-TOF est un champ d'innovation en pleine expansion. Bien que très peu d'études soit encore disponible, les premiers travaux ont montré que la MALDI-TOF MS permet d'obtenir une identification précise des espèces de champignons filamenteux, y compris au sein des complexes d'espèces. La MALDI-TOF MS représente ainsi le premier outil permettant une identification rapide, précise et standardisée des filamenteux.

#### **I.3.3.1. Principe**

La technologie MALDI - TOF / MS (pour Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight / Mass Spectrometry) est une méthode récemment développée pour l'identification rapide et précise de micro-organismes.

Elle est composée de trois unités fonctionnelles : (1) une source d'ions qui assure l'ionisation et la vaporisation des molécules de l'échantillon ; (2) un analyseur de masse séparant les ions selon leur masse et leur charge ; (3) un détecteur des ions ainsi séparés. La technologie MALDI assure la production d'ions par désorption / ionisation. L'échantillon est piégé dans une matrice composée de petites molécules acides, comme l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), qui est ensuite soumise à de brèves

impulsions laser. La matrice absorbe l'énergie de ces impulsions et l'utilise pour la désorption des molécules qui sont vaporisées et ionisées. Les molécules ainsi obtenues sont accélérées grâce à un champ électrostatique, puis injectées dans un tube de vol. Le temps de vol (TOF) nécessaire aux ions pour rejoindre le détecteur varie avec leur masse et leur charge, les plus petits ions voyageant plus rapidement que les plus volumineux. Les ions séparés selon leur temps de vol sont détectés à l'aide d'un spectromètre de masse (MS). Le spectre obtenu est caractérisé par le ratio masse / charge et l'intensité des ions et correspond à la signature de l'échantillon. Cette dernière est comparée à une base de données qui permet l'identification du micro-organisme au rang de genre ou d'espèce (Croxatto, 2012).

### **I.3.3.2. Nettoyage de la cible**

Il consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude puis la frotter avec du papier en versant dessus de l'éthanol à 70%. La cible est ensuite plongée dans l'éthanol pendant 15 mn, frottée avec 500µl du TFA (Acide TriFluorocétique) à 80% puis rincée avec de l'eau HPLC. Cette dernière est, enfin, laissée sécher à l'air libre.

### **I.3.3.3. Préparation de la matrice**

Une matrice solide est utilisée comme véhicule pour la substance à analyser à l'aide de laser pour l'analyse MALDI. Cette matrice permet de protéger l'échantillon d'une ionisation directe, de refroidir les ions grâce à une distribution plus fine de l'énergie cinétique, d'améliorer le rendement d'ionisation et aussi de ne pas ajuster la longueur d'onde de travail du laser à la longueur d'onde d'absorption de chaque échantillon.

Une solution de matrice saturée a été préparée, sous une hotte chimique, dans un tube Eppendorf par addition de 2 spatules de la matrice (typiquement d'alpha- cyano- 4 hydrocinnamic acide, HCCA) à 500 µl d'acetonitril HPLC, 250 µl de TFA à 10% et 250 µl d'eau HPLC, une petite quantité de matière insoluble est observée.

La solution est agitée, soniquée au bain à ultrasons (pendant 10 minutes), centrifugée à 13000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant est transféré dans un tube à Eppendorf propre. La matrice est, ainsi, prête à l'emploi.

#### **I.3.3.4. Préparation des échantillons et analyse spectrométrique**

Les isolats des mycètes ont été réensemencés sur des plaques de Sabouraud Chloramphenicol Gentamicin (OXOID, France) pendant 2 à 10 jours à 30 ° C. Les hyphes et les spores fongiques étaient récoltés par grattage des colonies fongiques avec une anse de platine stérile et soumis à une extraction à l'aide d'acide formique et de l'acétonitrile. Les extraits ont été, ensuite, déposés en quatre répliques sur le Cible MALDI-TOF et recouvert de 1 µL de solution matricielle ( $\alpha$ -cyano-4 hydroxycinnamic acid). Les spectres ont été acquis à l'aide d'un instrument UltrafleXtreme™ (Bruker Daltonics, Allemagne).

#### **I.3.3.5. Traitement des données avec le logiciel Biotyper v2.1 (Bruker Daltonics)**

Les données ont été automatiquement acquises puis exporté vers MALDI Biotyper v2.1 (Bruker Daltonics). L'identification a été effectuée en comparant les Spectres obtenus de chaque isolat à une Bibliothèque de spectres de référence de champignons filamenteux. La concordance des spectres obtenus à partir des isolats fongiques étudiés avec ceux des souches de référence est traduite par des scores (de 0 jusqu'à 3) qui indiquent le degré de confiance à accorder à l'identification (Lartigue *et al*, 2009; Cherkaoui *et al*, 2010). Un score supérieur à 2,000 (ou compris entre 2,000 et 3,000) indique une bonne fiabilité et une forte probabilité d'identification de l'espèce. Le rang du genre, à ce score étant totalement sécurisé (Gidenne, 2011 ; Blondiaux, 2013 ; Normand *et al.*, 2013).

## CHAPITRE II : DETERMINATION DU PROFIL DE RESISTANCE

### II.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la technique de diffusion

Contrairement à l'effet fongistatique, il n'existe pas de méthode standardisée permettant l'évaluation de l'effet fongicide. Il peut être mesuré par la Concentration Minimale Fongicide (CMF) qui est définie par certains auteurs comme la plus faible concentration de fongicide capable de réduire de 99,9% la population initiale après un temps donné (Graybill *et al*, 1997). Une meilleure approche de l'effet fongicide est obtenue par l'étude de la cinétique de mortalité d'une souche en présence de différentes concentrations de l'antifongique (Manavathu *et al*, 2004).

La présente étude a été conduite afin de tester la sensibilité des souches précédemment isolées aux fongicides couramment utilisés (Raxil® 060 FS, Amistar®Xtra, et l'Artéa® 330EC) (Tableau 02). Toutes les molécules testées sont de la famille chimique des triazolés. Cette étude permettra de déterminer l'efficacité ou non des fongicides testés sur les différents isolats. Le choix de ces produits est basé sur le fait que ce sont ceux mentionnés par les producteurs comme étant utilisés pour le traitement de la culture de blé et pratiqués par les agriculteurs à Constantine.

Tableau 2: Liste des fongicides utilisés

Nom commercial	Matière active	Dose matière Active (g/L)	Type de formulation	Dose appliquée	Mode d'action
Raxil®060 FS	Tébuconazole	60	Suspension Fluide	0.5 L/300 L d'eau/ha	Systémique
Amistar®Xtra	Azoxystrobine Cyproconazole	200 80	Liquide	0.5 L/300 L d'eau/ha	Systémique et de contact
Artéa ®330EC	Cyproconazole. propiconazole	80 250	Concentré Emulsionnable	0.5 L/300 L d'eau/ha	Systémique

### II.1.1. Préparation des souches

Les champignons sur lesquels ces fongicides ont été testés ont été cultivés sur milieu PDA acidifié et mis en incubation à 28°C, à l'obscurité, pendant 07 jours.

### II.1.2. Préparation des fongicides

Pour les tests *in vitro*, les concentrations des fongicides indiquées par le fabricant ont été respectées pour préparer les solutions stocks de 10 ml des fongicides. A partir des solutions stocks de chaque fongicide, six volumes (170 µl, 190 µl, 200 µl, 230 µl, 250 µl et 270 µl dilués dans 114 ml d'eau distillé stérile) ont été prélevées pour être incorporés au milieu de culture PDA coulé en surfusion dans des boîtes de Pétri de 9 cm à la température de 45 °C environ (Tableau 03).

Tableau 3 : Les concentrations (µl/ml) des fongicides utilisées dans le milieu PDA

Fongicides	Concentration (µl/114ml)					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Raxil® 060 FS	170	190	200	230	250	270
Amistar®Xtra						
Artéa®330EC						

D1, D2, D3, D4, D5 et D6 constituent les différentes concentrations de fongicides en boîte de Pétri.

### II.1.3. Technique de diffusion

Des sections de 5 mm de diamètre de culture sont effectuées et déposées sur les milieux solidifiés incorporés des différents fongicides pour les traitements et sur milieu solidifié sans fongicide pour le témoin (contrôle). Pour chaque traitement, trois répétitions ont été effectués.

La Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la technique de diffusion a été effectuée selon la méthode proposée par (Koffi, *et al* 2009) avec quelques modifications. Pour chaque traitement, le paramètre diamètre moyen de la croissance radiale du mycélium des isolats a été mesuré. Les mesures ont été effectuées après 10 jours d'incubation. Ensuite, Le pourcentage d'inhibition de croissance a été calculé avec la moyenne de croissance radiale du mycélium pour chaque dose. Ce qui a permis de déterminer le niveau de résistance ou de sensibilité des isolats aux fongicides testés. Le

pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule et l'échelle de sensibilité proposée par Kumar *et al* (2007) :

$$I = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Où,

$I$  = Pourcentage d'inhibition

$C$  = Croissance radiale (mm) du témoin

$T$  = Croissance radiale (mm) du traitement

Le niveau de sensibilité ou de résistance de l'isolat a été déterminé selon l'échelle de Kumar *et al* (2007). Pour  $I$  :

- > 90% Hautement Sensible
- > 75-90% Sensible
- > 60-75% Modérément Résistant
- > 40-60% Résistant
- < 40% Hautement Résistant

## II.2. Analyse statistique

Le dispositif expérimental est un plan complet à deux critères de classification : cas d'un modèle hiérarchisé. Facteur A : les différents types de fongicide. Facteur B : les doses de fongicide appliquées en boîtes de Pétri. Une analyse de variance (ANOVA) associée au test de comparaison de moyennes de Newman & Keul a été effectuée pour comparer plus de deux moyennes de plusieurs populations à partir des données d'échantillons aléatoires simples et indépendants et distinguer les groupes selon les valeurs des moyennes des variables à tester. Le seuil de signification est de 5%. Le logiciel utilisé est Statistica 9.0.

## CHAPITRE III : DETECTION DES MUTATIONS DE RESISTANCE DANS LE GENE *CYP51*

La détection de souches résistantes aux azolés est de plus en plus fréquente dans de nombreux pays. En effet, l'utilisation des fongicides azolés dans l'environnement aurait un impact sur l'apparition de mécanismes de résistance particuliers (Rocchi, 2015). Les fongicides azolés ont pour cible l'ergostérol, un stérol majeur de la membrane cellulaire fongique. Ce constituant essentiel est synthétisé à partir du lanostérol (par suppression du groupe méthyl en position C14) sous l'action de l'enzyme 14-alpha déméthylase dépendante du cytochrome P450, codée chez les champignons filamenteux par le gène *cyp51*. Ce dernier est représenté par un, deux ou trois paralogues *cyp51A*, *cyp51B* et *cyp51C* selon le genre (Becher, 2011).

Plusieurs mécanismes modifiant la qualité et/ou la quantité de cette enzyme cible sont à l'origine de résistance des mycètes vis-à-vis des azolés. La résistance aux azolés peut être primaire et existe naturellement (Alcazar-Fuoli, 2008) ou secondaire (acquise), après l'exposition à un traitement. Plusieurs mécanismes de résistance acquise existent chez les azolés et les plus fréquents impliquent des mutations sur le gène *cyp51A* (région codante de 2048 pb). Ces mutations sont retrouvées le plus souvent sur les codons 54, 98, 138 et 220 (Snelders, 2008 ; Denning, 2011 ; Stensvold, 2012).

L'objectif majeur de cette partie est de vérifier par approche bioinformatique, si les isolats présentent une mutation de *cyp51A* pouvant être associée à un phénomène de résistance.

### III.1. Résistance par mutation de la cible *cyp51A*

#### III.1.1. Souches étudiées

Dans cette partie, les six isolats inclus dans l'étude de sensibilité aux fongicides triazolés ont été analysés. Pour cela, ils ont été réensemencés sur milieu nutritif (Sabouraud dextrose agar complétée avec 0,5% de chloramphénicol) et placés dans l'étuve pendant 7 jours à 37°C (Borman *et al*, 2010). L'ADN de chacun d'eux a été extrait avec le Kit Quiagen comme décrit précédemment. L'extraction de l'ADN a été réalisée au sein du laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale La Timone, Marseille (France).

### III.1.2. Séquençage du *cyp51A*

Les extraits d'ADN ont été analysés au moyen de deux tests PCR en temps réel. Un pour la détection des espèces, l'autre pour identifier les mutations de résistance en utilisant le Mix LC480 de chez Roche (France) pour la première PCR et le mix BigDye Terminator de chez Applied (France) pour la seconde. L'amplification a été réalisée sur 45 cycles. La région de *cyp51A*, y compris le promoteur, a été amplifiée par PCR dans trois fragments en utilisant les amorces appropriées :

Région promotrice : Primers A5 (*Afcyp51-A5=5'* – TCTCTGCACGCAAAGAAGAAC – 3') et A7 (*Afcyp51-A7=5'* – TCATATGTTGCTCAGCGG – 3') (Marut *et al*, 2016).

- Fragment CDS 1 : *Afcyp51A-F1F=5'*-TAATCGCAGCACCACTTCAG-3' et *Afcyp51A-F1R=5'* GAGGACTTTTGGCTGTGAGG -3')
- Fragment CDS 2 : *Afcyp51A-F2F=5'*- ATTGTCCCAATTCCAAGCTG 3' et *Afcyp51A-F2R=5'*- CCGATCACACCAAATCCTTT -3'

Le mélange PCR contient 5 ml d'extrait d'ADN et 20 ml de mélange composé de 0,625 U de GoTaq Hot Start Polymérase, 1xColorlessGoTaqFlexi Buffer, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de mélange dNTP et 0,2 mM de chaque amorce. Le programme d'amplification consistait en 5 min à 94 ° C, 30 cycles de 30 s à 94 ° C, 30 s à 58 ° C et 1 min à 72 ° C, suivi d'une étape finale de 10 min à 72 ° C. Le séquençage a été effectué en utilisant un (ABI PRISM 3130) Analyseur génétique chez (Applied Biosystems) (Guegan *et al*, 2018). Les amplicons ont été migrés en électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un agent intercalant (GelRed, Interchim) et visualisée sous UV. Les amplicons présentant un signal suffisamment important ont été transmis à la société GenoScreen pour être séquencés. Les images de gel ont été capturées (Hulvey *et al*, 2017).

### III.1.3. Analyse des séquences

- Les séquences du gène *cyp 51A* ont fait l'objet d'une analyse bioinformatique par :
- recherche d'homologie en utilisant le programme BlastX (Blast local Alignment SearchTool for nucléotides) sur la base de données génomique Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>) hébergée au sein du portail NCBI (National Center For Biotechnology Information). Ce programme analyse la séquence nucléique cible et propose une protéine homologue à celle de notre allèle,



- la séquence peptidique proposée par le BlastX a été annotée sur le portail ExPASy en utilisant la base de données protéique UniProtKB. Cette étape permet d'identifier la structure de la protéine et sa fonction,
- En fin, les séquences nucléiques du gène *cyp51A* ont été également annotées par approche ORF (Open Reading Frames) dans laquelle l'allèle est lu dans six cadres de lecture différents pour déterminer la protéine qui correspond à l'allèle étudié. Cette dernière est à son tour confrontée aux bases de données protéiques (UniProtKB et Pfam) pour mettre en évidence une éventuelle homologie.

## CHAPITRE I: ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES

### I.1. Résultats de l'isolement des champignons phytopathogènes du blé

#### I.1.1. Semences du blé

Durant les deux saisons, au total 114 isolats fongiques ont été mis en évidence en utilisant les deux méthodes d'isolement, avec 71 isolats pour la méthode indirecte et 43 isolats pour la technique directe. Concernant la méthode de suspension-dilution, 53/71 isolats ont été mis en évidence pour les semences de blé non traité. Les genres identifiés sont : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Botrytis* et *Cladosporium*. Quant aux 10 espèces détectées, elles concernent *A.flavus*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp2*, *T.harzianium*, *R.oryzea* *B.cinerea*, *Cladosporium sp* et *A.alternata*. Pour ce qui est des semences de blé dur traité par le RAXIL® 060 FS, celles-ci ont révélé la présence de 3 genres fongiques seulement incluant les espèces *A.flavus*, *A.niger*, *P.sp1*, *P.sp2* ainsi que *T.harzianium* avec 18/71 isolats. À travers cette étude le milieu PDA nous a donné le plus grand nombre de champignons (53/71) par rapport au milieu Gzapeck (18/71) (Tableaux 4 et 5).

**Tableau 4** : Résultats d'isolement à partir des semences de blé par la méthode de dilution (saison 2013-2014).

Blé Milieux	Blé traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Téliégma
PDA <sub>ac</sub>	2 <i>A. flavus</i> 2 <i>Penicillia</i> (1sp1, 1sp2) 1 <i>Trichoderma</i>	1 <i>A. flavus</i> 2 <i>Penicillia</i> (1sp1, 1sp2) 1 <i>Trichoderma</i> 1 <i>Botrytis</i> 1 <i>Alternaria</i> 1 <i>Rhizopus</i>	3 <i>Aspergillus</i> (2 <i>flavus</i> , 1 <i>niger</i> ) 2 <i>Penicillia</i> (1sp1, 1sp2)
PDA <sub>R</sub>	1 <i>A. flavus</i> 1 <i>P. sp1</i>	1 <i>A. flavus</i> 1 <i>Trichoderma</i> 1 <i>Botrytis</i>	1 <i>A. flavus</i> 3 <i>Penicillia</i> (2sp1, 1sp2)
CDA <sub>ac</sub>	1 <i>P. sp1</i>	1 <i>A. flavus</i> 1 <i>Rhizopus</i>	1 <i>A. flavus</i> 1 <i>Trichoderma</i>
CDA <sub>R</sub>	1 <i>A. niger</i>	3 <i>Aspergillus</i> (1 <i>flavus</i> , 1 <i>niger</i> , 1 <i>fumigatus</i> )	2 <i>Aspergillus</i> (1 <i>flavus</i> , 1 <i>niger</i> )

**Tableau 5** : Résultats d'isolement à partir des semences de blé par la méthode de dilution (saison 2014 -2015).

Blé Milieux	Blé traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Téléghma
PDA <sub>ac</sub>	2 <i>Aspergillus</i> ( <i>1A. flavus</i> , <i>1A. niger</i> ) 2 <i>Penicillia</i> (1sp1, 1sp2) 1 <i>Trichoderma</i>	2 <i>Aspergillus</i> ( <i>1 A. flavus</i> , <i>1A. niger</i> ) 2 <i>Penicillia</i> (sp1, sp2) 1 <i>Trichoderma</i> 1 <i>Rhizopus</i>	2 <i>A. flavus</i> 2 <i>Penicillia</i> (1sp1, 1sp2) 1 <i>Trichoderma</i>
PDA <sub>R</sub>	1 <i>A.flavus</i> 1 <i>P.sp2</i>	1 <i>A. flavus</i> 2 <i>Trichoderma</i> 1 <i>Botrytis</i> 1 <i>Cladosporium</i> 1 <i>Rhizopus</i>	1 <i>A.flavus</i> 2 <i>Penicillia</i> (1sp1, 1sp2)
CDA <sub>ac</sub>	1 <i>P. sp1</i>	1 <i>A. flavus</i>	1 <i>A.flavus</i>
CDA <sub>R</sub>	1 <i>A. flavus</i>	1 <i>A. flavus</i>	2 <i>Aspergillus</i> ( <i>1A. flavus</i> , <i>1A. niger</i> )

Concernant la méthode directe (papier buvard), cette dernière a permis de mettre en évidence 30/43 isolats pour les semences de blé non traité et 13 isolats pour celles traitées au RAXIL ® 060 FS. Les genres identifiés sont *Aspergillus* et *Penicillium* représentés respectivement par les espèces *A.flavus*, *A.niger* ainsi que *Penicillim.sp1* et *Penicillium.sp2* et ce, pour les deux types d'échantillons (Tableaux 6 et 7).

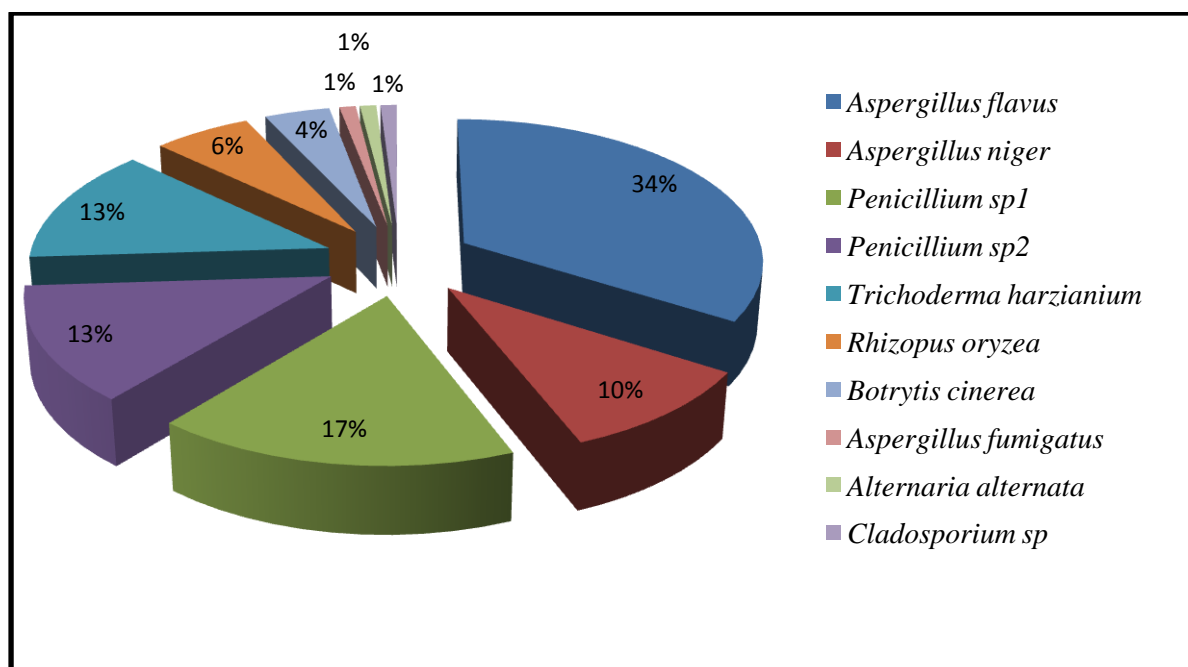
**Tableau 6** : Résultats d'isolement à partir des semences de blé par la méthode de papier buvard (saison 2013-2014).

Blé traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Teleghma
3 <i>A.flavus</i> 1 <i>A.niger</i> 1 <i>Penicillium.sp1</i>	2 <i>A.flavus</i> 3 <i>A niger</i> 3 <i>Penicillia</i> (2sp1, 1sp2)	3 <i>A. flavus</i> 1 <i>A. niger</i>

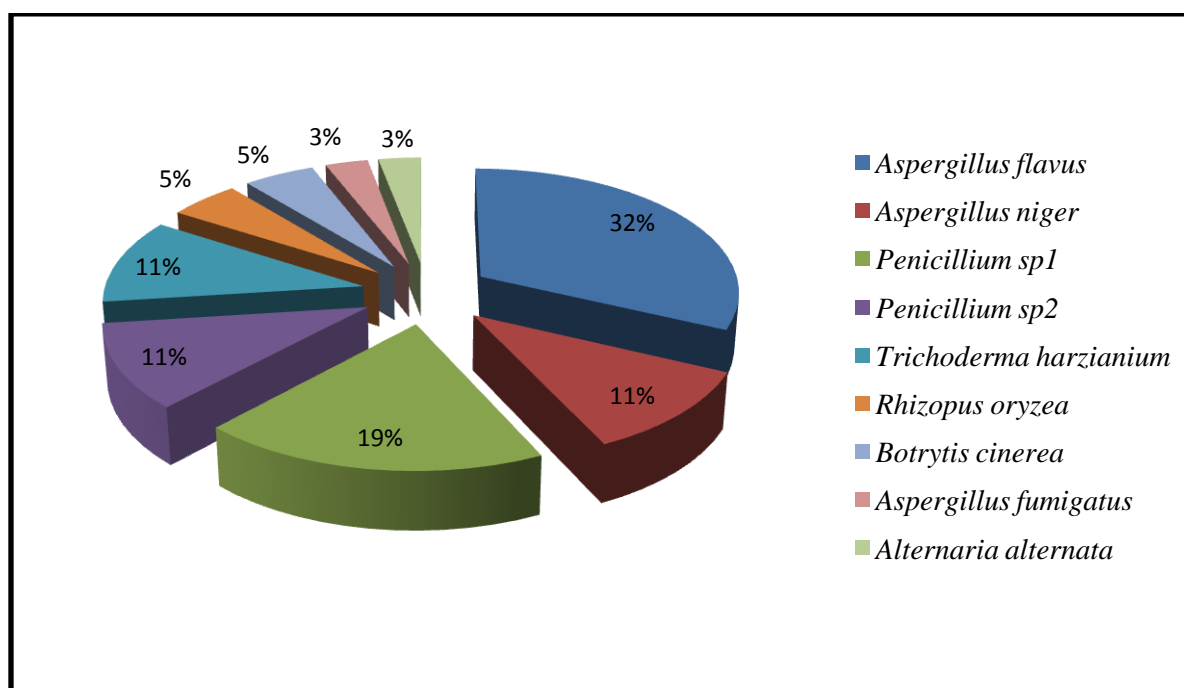
**Tableau 7** : Résultats d'isolement à partir des semences de blé par la méthode de papier buvard (saison 2014-2015).

Blé traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Constantine (Hamma Bouziane)	Blé non traité Télighma
4 <i>A. flavus</i>	5 <i>A. flavus</i>	4 <i>A. flavus</i>
2 <i>A. niger</i>	2 <i>A. niger</i>	3 <i>A. niger</i>
2 <i>Penicillia</i> ( <i>1sp1</i> , <i>1sp2</i> )	3 <i>Penicillia</i> ( <i>2sp1</i> , <i>1sp2</i> )	1 <i>A. fumigatus</i>

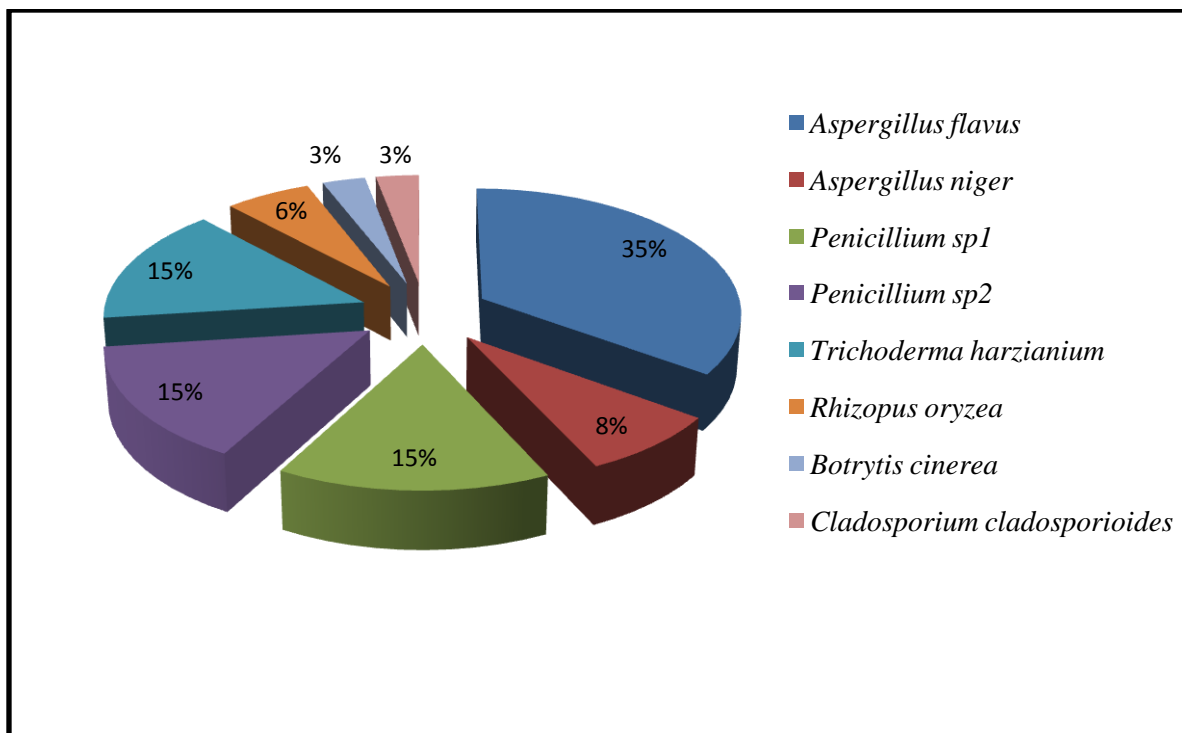
Nos résultats ont montré que durant les deux saisons, *Aspergillus* domine majoritairement la flore isolée des deux échantillons des semences (traité et non traité) avec 45% et représenté par 3 espèces *A. flavus* (34 %), *A. niger* (10%) et *A. fumigatus* (1%), suivie par le genre *Penicillium* avec 30% dont *P. sp1* (17 %) et *P. sp2* (13%), *P. sp2* et *T. harzianum* présentent des niveaux de contaminations similaires (Figure16). Nos échantillons analysés ont montré un pourcentage beaucoup plus faible de contamination par les espèces *R. oryzae* (6%), *B. cinerea* (4%), *A. fumigatus* (1%), *C. sp* (1%) et *A. alternata* (1%). Les espèces *A. fumigatus* et *A. alternata* ont été isolés durant la saison 2013-2014 seulement (Figure 17) tandis que l'espèce *Cladosporium. sp* a été isolée en 2014-2015 (Figure 18). Ce résultat obtenu dans notre travail, pourrait être attribué aux conditions climatiques ou de stockage.



**Figure 16:** Fréquence totale des moisissures associées aux semences de blé dur non traitées et traitées par le Raxil® 060 FS durant les deux saisons



**Figure 17:** Fréquence des espèces isolées par la méthode indirecte à partir des semences de blé dur non traitées et traitées par le Raxil ® 060 FS durant la saison 2013-2014



**Figure 18:** Fréquence des moisissures isolées par la méthode indirecte à partir des semences de blé dur non traitées et traitées par le Raxil® 060 FS durant la saison 2014-2015

### I.1.2 Feuilles et épi de blé

Durant les saisons concernées par l'étude, au total 55 isolats fongiques ont été mis en évidence en utilisant les différentes méthodes d'isolement. 35/55 isolats ont été isolés à partir des feuilles (19/35 pour la méthode directe et 16/35 pour la technique de la chambre humide), avec 26/35 isolats pour le blé non traité et 9/35 pour le blé traité par l'Amistar®Xtra et l'Artea®330EC. Concernant l'isolement à partir des épis de blé, 20 isolats ont été mis en évidence avec 16/20 pour le blé non traité et 4/20 pour le blé traité par l'Amistar®Xtra et l'Artea®330EC. Les 3 genres identifiés sont : *Penicillium*, *Trichoderma*, et *Alternaria*. Quant aux 4 espèces détectées, elles concernent *Penicillium. sp1*, *Penicillium. sp2*, *T.harzianum*, et *A. alternata*. Durant les deux saisons l'Artea®330EC montre plus d'efficacité par rapport à l'Amistar®Xtra, ceci s'exprime par le nombre d'isolats (30 pour les échantillons traités par l'Amistar®Xtra et 25 pour celles traités par l'Artea®330EC) (Tableaux 8 à 11).

**Tableau 8** : Espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par le fongicide Amistar® Xtra (saison 2013/2014).

Fragment à analyser Echantillon du blé dur	Feuilles (Technique directe)	Epi (Technique directe)	Feuilles (Technique de la chambre humide)
Blé traité Constantine	<i>1 Penicillium. sp1</i>	<i>1 Trichoderma</i>	<i>1 Alternaria</i>
Blé non traité Constantine	<i>1 Penicillium. sp1</i> <i>1 Trichoderma</i>	<i>1 Penicillium. sp2</i> <i>1 Trichoderma</i>	<i>2 Alternaria</i>
Blé non traité Télégma	<i>1 Penicillium. sp2</i>	<i>1 Penicillium. sp1</i> <i>1 Trichoderma</i>	<i>1 Alternaria</i>

**Tableau 9** : Espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par le fongicide Artea®330EC saison 2013-2014).

Fragment à analyser Echantillon du blé dur	Feuilles (Technique directe)	Epi (Technique directe)	Feuilles (Technique de la chambre humide)
Blé traité Constantine	<i>1 Alternaria</i>	<i>1 Penicillium. sp1</i>	<i>1 Alternaria</i>
Blé non traité Constantine	<i>1 Alternaria</i>	<i>1 Penicillium. sp1</i> <i>1 Alternaria</i>	<i>1 Alternaria</i>
Blé non traité Télégma	<i>1 Penicillium.sp1</i> <i>1 Alternaria</i>	<i>1 Penicillium. sp1</i>	<i>1 Alternaria</i>

**Tableau 10** : Espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par l'Amistar® Xtra (saison 2014-2015).

Fragment à analyser Echantillon du blé dur	Feuilles (Technique directe)	Epi (Technique directe)	Feuilles (Technique de la chambre humide)
Blé traité Constantine	1 <i>Penicillium. sp1</i> 1 <i>Trichoderma</i>	1 <i>Trichoderma</i>	1 <i>Penicillium. sp1</i>
Blé non traité Constantine	1 <i>Penicillium. sp1</i> 1 <i>Trichoderma</i>	1 <i>Penicillium. sp1</i> 1 <i>Trichoderma</i>	2 <i>Alternaria</i>
Blé non traité Teleghma	1 <i>Penicillium. sp2</i> 1 <i>Alternaria</i>	2 <i>Penicillium</i> (1 <i>sp1</i> , 1 <i>sp2</i> ) 1 <i>Trichoderma</i>	2 <i>Alternaria</i>

**Tableau 11** : Espèces isolés à partir des feuilles et épis de blé traités par l'Artea®330EC (saison 2014 -2015).

Fragment à analysée Echantillon du blé dur	Feuilles (Technique directe)	Epi (Technique directe)	Feuilles (technique de la chambre humide)
Blé traité Constantine	1 <i>Alternaria</i>	1 <i>Penicillium. sp1</i>	1 <i>Alternaria</i>
Blé non traité Constantine	2 <i>Alternaria</i>	1 <i>Penicillium. sp1</i> 1 <i>Alternaria</i>	1 <i>Alternaria</i>
Blé non traité Télégma	1 <i>Penicillium. sp2</i> 1 <i>Alternaria</i>	1 <i>Penicillium. sp2</i> 1 <i>Alternaria</i>	2 <i>Alternaria</i>

## I.2. Identification des isolats

L'identification des champignons filamenteux en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire. L'étude des caractères macroscopiques pourtant sur la couleur, l'aspect de colonie et le revers des boîtes, et microscopiques dont la forme de thalle et des spores des souches fongiques isolées, a permis d'identifier 7 genres dont *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Alternaria*, et *Cladosporium* et 10

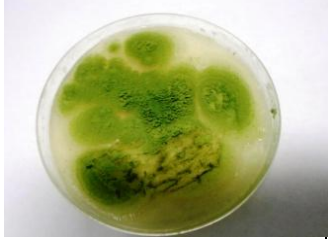
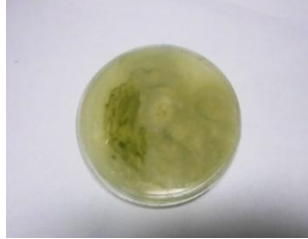
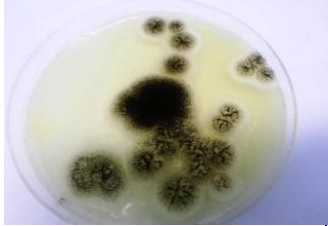






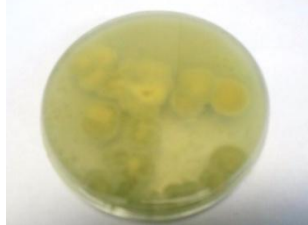
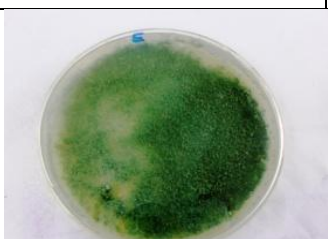



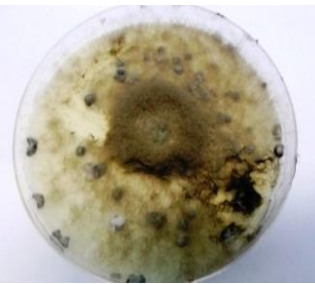
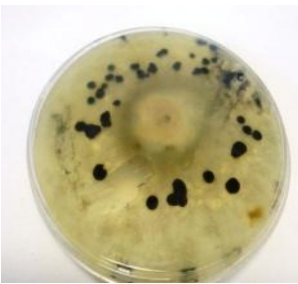






espèces *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium. sp1*, *Penicillium. sp2*, *T. harzianum*, *R. oryzae*, *B. cinerea*, *Cladosporium. sp* et *A. alternata*.

### I.2.1. Aspect macroscopique

Après ensemencement sur les différents milieux de culture gélosés, les colonies des Souches d'*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium. sp1*, *Penicillium. sp2*, *T. harzianum*, *R. oryzae*, *B. cinerea*, *Cladosporium sp* et *A. alternata* apparaissent au bout de 7 à 10 jours d'incubation. Les caractères macroscopiques (la couleur de colonie et le revers des boites) sur le milieu PDAac après purification des précédents isolats sont rassemblés dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** Aspects macroscopiques des souches isolées après 10 jours d'incubation

Espèces	Colonies/PDAac	Revers/PDAac
<i>A. flavus</i> : Colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers est incolore		
<i>A. niger</i> : Les colonies sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est jaune pâle		
<i>A. fumigatus</i> : Colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers est jaune.		
<i>Penicillium. sp1</i> : Colonies granuleuses blancs puis vert-gris après 3 à 4 jours d'incubation, Le revers est blanc		
<i>Penicillium. sp2</i> : Colonies plates blancs au début, puis vert-gris après 4 jours d'incubation. Le revers est jaune-pâle		
<i>T. harzianum</i> : Colonies de couleur blanc puis verdâtre à aspect farineux. Se développe rapidement. Le revers est incolore.		

<p><i>B. cinerea</i> :</p> <p>Le mycélium produit est aérien. Les colonies sont de couleur blanche grisâtre au début puis elles deviennent grises claires à grises brun à la fin de la période de l'incubation (à partir du 7<sup>ème</sup> jour). Les sclérotés varient également en abondance, en dimension et en distribution. Ils sont au début de leur formation blanchâtre puis ils se durcissent et enfin se noircissent, Ils sont superficiels.</p>		
<p><i>R. oryzae</i> :</p> <p>Les colonies sont étendues, velues, avec une couleur qui va du blanchâtre au grisâtre. Le revers est incolore.</p>		
<p><i>A. alternata</i> :</p> <p>Colonies de couleur brune à noire, Le revers est noir.</p>		
<p><i>C. sp</i> :</p> <p>Les colonies apparaissent de couleur vert foncé, poudreuses revers verdâtre à noir, petites colonies en chaînes fusiformes.</p>		

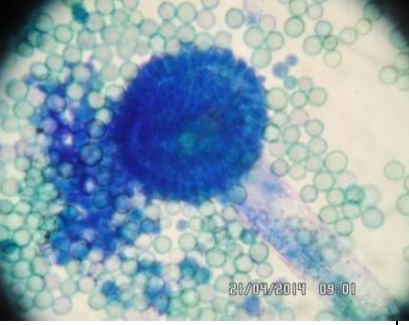
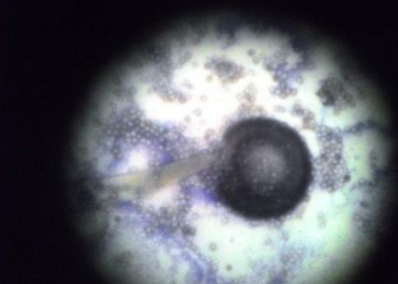

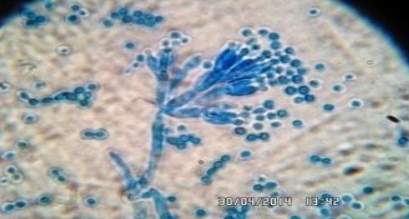

### I.2.2. Aspect microscopique


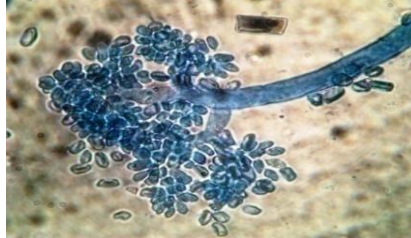



Suivant les clefs d'identification de Barnett et Hunter (1972) et Botton (1990), les espèces *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp2*, *T. harzianum*, *R. oryzae*, *B. cinerea*, *Cladosporium sp* et *A. alternata* sont identifiées.

Les lames préparées sont observées au microscope optique. Il apparaît que les souches d'*Aspergillus* ont développés un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule. Des phialides formées sur des métules et des conidies en chaîne unicellulaires. Les souches de *Penicillium* ont un mycélium de type cloisonné portant de nombreux conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; le Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiospores.

Les caractéristiques microscopiques (hyphes cloisonnés ou non, type et apparence du système sporale, caractéristiques de la spore asexuée...) des précédents isolats sont rassemblées dans le tableau 11.

**Tableau 13 :** Aspects microscopiques des souches isolées après 10 jours d'incubation

Espèces	Aspect microscopique GX40
<p><i>A. flavus</i> :</p> <p>Les têtes aspergillaires d'<i>A. flavus</i> sont radiaires. Le mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule, les vésicules sont sub-globuleuses. Des phialides formées sur des métules, Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de couleur verte pâle</p>	
<p><i>A. niger</i> :</p> <p>Mycélium cloisonné. Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, noirs à maturité les vésicules sont globuleuses. Les conidies sont habituellement globuleuses, de couleur brune.</p>	
<p><i>A. fumigatus</i> :</p> <p>Les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses</p>	
<p><i>Penicillium sp1</i> :</p> <p>Le mycélium est septé. Phialides sur des métules portées par des rameaux sur le conidiophore, le conidiophore est droit, avec des verticilles au sommet. Les conidies sont en chaînes, avec une forme globuleuse</p>	
<p><i>Penicillium sp2</i> :</p> <p>Mycélium cloisonné. phialides directement liés au conidiophore qui porte des Pinceaux monoverticillés. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses</p>	

<p><i>T. harzianum</i> :</p> <p>Le conidiophore est ramifié, et produit des phialides qui naissent plus au moins perpendiculairement au conidiophore et portent à leur sommet des conidies globuleuses, de couleur verte.</p>	
<p><i>B. cinerea</i> :</p> <p>Les Conidiophores de <i>B.cinerea</i> sont grands et dressés et plus ramifiés vers le haut où ils présentent des renflements, ces renflements portent de conidies solitaires unicellulaires.</p>	
<p><i>R. oryzae</i> :</p> <p>Chlamydo-spores isolées ou en chaînes, sphériques à ovoïdes. Le mycélium aérien est très développé et non cloisonné. Le sporocystophore se termine par une columelle autour de laquelle se différencient les spores.</p>	
<p><i>A. alternata</i> :</p> <p>Les conidiophores sont solitaires ou formant de petits groupes, simples ou ramifiés, droits ou flexibles, souvent géniculés, de couleur olivâtre à brun doré. Les conidies se forment en longueur, souvent branchées en chaîne jusqu'à 10 conidies par chaîne, ovoïdes ou elliptiques, de couleur pale à brun doré, cloisonnées longitudinalement et transversalement.</p>	
<p><i>Cladosporium sp</i> :</p> <p>hyphes non ramifiés. Conidiophores solitaires de couleur marron à brun olive comprennent de nombreuses longues chaînes ramifiées de conidies, Les conidies sont petites, unicellulaires, en forme de citron.</p>	

### I.3. Amplification et séquençage de l'ARNr 18S avec des amorces universelles

Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude est le gène ribosomal 18s. Très représenté dans les banques de données. Ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences à un groupe d'organismes connu.

Les ADN codants pour les ARN ribosomiaux 18S des isolats ont d'abord été amplifiés par la technique de la PCR (pan-fongique). Les produits de la PCR ont été séquencés et les séquences obtenues (Annexe 3) ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base

de données Genbank. L'analyse des séquences d'ARNr 18S et les séquences de la région ITS1 et ITS4 des souches fongiques de la banque a permis d'affilier les 10 isolats aux espèces : *P. griseofulvum* (isolat1), *P. glabrum* (isolat 2), *A. flavus* (isolat 3), *A. niger* (isolat 4), *T. harzianum* (isolat 5), *A. alternata* (isolat 6), *B. cinerea* (isolat 7), *A.fumigatus* (isolat 8), *R. oryzae* (isolat 9) et *C. cladosporioides* (isolat 10).

- L'isolat 1 : La séquence d'ARNr 18S de la souche 1 présente 99% d'identité avec celle de *P. griseofulvum* (AY373917.1).

- L'isolat 2 : La séquence d'ARNr 18S de la souche 2 présente 99% d'identité avec celle de *P.glabrum* (KT192279.1).

- L'isolat 3: Les séquences de la région ITS1 de la souche 3 présente 100% d'identité avec celle d'*A. flavus* (LN482517.1).

- L'isolat 4 : L'isolat 4 présente des homologies de 99% avec l'espèce *Aspergillus niger* (KY566164.1)

- L'isolat 5 : La séquence d'ARNr 18S de la souche 5 présente 99% d'identité avec celle de *T. harzianum* (KU319055.1).

L'isolat 6 : La séquence d'ARNr 18S de la souche 6 présente 99% d'identité avec celle d'*A. alternata* (MG282916.1)

- L'isolat 7 : L'isolat 7 présente des homologies de 99% avec l'espèce *B. cinerea* (KT266231.1).

- L'isolat 8 : L'isolat 8 présente des homologies de 96% avec l'espèce *A. fumigatus* (KF815581.1).

- L'isolat 9 : L'isolat 9 présente des homologies de 99 % avec l'espèce *R. oryzae* (KY260672.1)

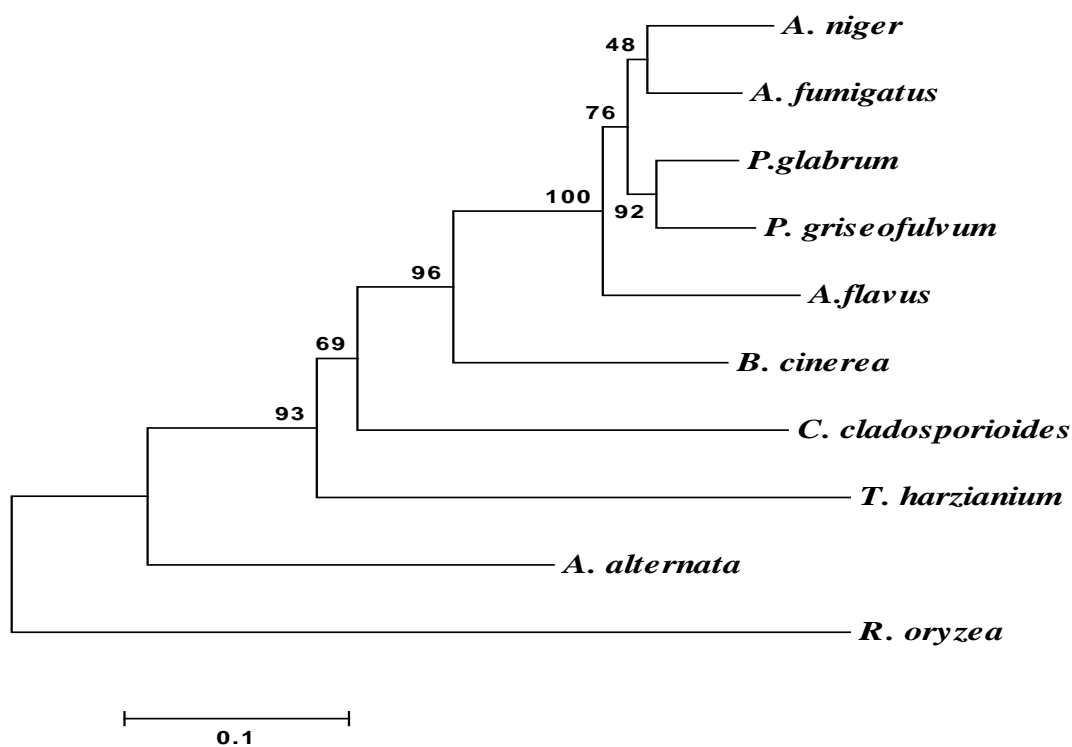
- L'isolat 10 : L'isolat 10 présente des homologies de 99 % avec l'espèce *C.cladosporioides* (KC113301.1).

#### I.4. Analyse phylogénétique

A partir des séquences obtenues après amplification avec la paire d'amorces universelle, une étude phylogénétique à été réalisée. Des alignements des séquences sont

réalisés par ClustalW. L'arbre est construit à partir de Neighbor-joining en utilisant le test de bootstrap (nombres sur les branches) de 1000 réplifications en utilisant les distances de Kumura qui prend en compte les transitions et les transversions du programme MEGA6 (Tamura *et al*, 2007) (Figure 19). Le séquençage du gène de l'ARNr 18s et l'alignement avec des séquences extraites de Genbank confirme l'appartenance des isolats 1 à 10 aux espèces *P. griseofulvum*, *P. glabrum*, *A. flavus*, *A. niger*, *T. harzianum*, *A. alternata*, *B. cineria*, *A. fumigatus*, *R. oryzea* et *C. cladosporioides* respectivement.

Les séquences obtenues des dix souches (1,2,3,4,5,6,7,8,9 et 10) ont été enregistrées au niveau de Genbank sous les numéros d'accessions respectifs : *HHEKD8AW014*, *HHEVXUXS015*, *HHF4127H01R*, *HHFJNBH8014*, *HHG72VYS014*, *HHGTTDBR015*, *HHH573TC014*, *HHH9GMBB015*, *HHHYS38901R*, *HHJG7437015*



**Figure 19:** Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ARNr 18s. Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. 0.1 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

## I.5. Analyse par MALDI-TOF MS

Pour une éventuelle amélioration du taux de rendement, en termes d'espèces, une identification complémentaire par la méthode spectrométrique (MALDI-TOF MS) a été

effectuée. Cette dernière a mis en exergue, en plus des mêmes espèces identifiées par PCR, l'espèce *A. tubingensis*. Les autres étant *A. flavus*, *A. fumigatus*, *P. griseofulvum*, *P. glabrum*, *T. harzianum*, *R. oryzae*, *B. cinerea*, *A. alternata* et *C. cladosporioides*.

## I.6. Discussion

Selon Azhar Hussain, 2009, le blé dur est fréquemment exposé à de nombreux agents pathogènes transmis par la semence ce qui entraîne une perte qualitative et quantitative du rendement donc la semence saine est considérée comme un facteur limitant pour réussir une année agricole. L'un des aspects les plus importants d'une bonne semence, est d'être dénué d'agents pathogènes.

Du point de vue diversité des souches isolées, il n'y avait pas de différence significative entre les deux échantillons de blé dur analysés (traité et non traité). Nos résultats ont montré que la mycoflore isolée était diversifiée avec 7 genres fongiques. La contamination des céréales par ces genres fongiques a été rapportée dans plusieurs études en Algérie (Moghtet, 2012) ainsi que d'autres pays méditerranéens tels que la Tunisie et le Maroc (Belkacem-Hanfi, 2013; Tahani, 2008, Riba, 2010) et également en Europe (Gregori, 2013; Magan, 2003; Medina, 2006; Tabuc, 2009) et en Afrique du Sud (Rabie, 1997).

Les résultats de l'analyse mycologique ont montré, quelque soit l'année de la récolte, une nette dominance du genre *Aspergillus*. La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminée des céréales a été reportée dans plusieurs travaux (Pitt et Christian, (1968) ; Pitt et Miscamble, (1995) ; Riba et al, 2005 ; Tahani *et al.* (2008) Et Houssou, (2009)).

Les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus dominantes dans nos échantillons de céréales. Ces genres sont considérés comme des moisissures de stockage car ils tolèrent l'humidité la plus faible. (Christensen, 1977 ; Tahani, 2008 ; Gacem, 2011 ; Singh, 2011 ; Belkacem -Hanfi, 2013).

*A. flavus* est l'espèce la plus fréquente suivie de *Penicillium*. Les autres genres de mucorales, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Botrytis* et *Cladosporium* isolés sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol se qui est en accord avec les études de Christensen (1977).

Il en ressort, également, à travers cette étude que la méthode de dilution a donné le plus grand nombre de champignons par rapport à la méthode du papier filtre. Cependant,



d'autres auteurs ont rapporté que cette dernière permettait l'isolement de la majorité des champignons contrairement à la méthode de suspension-dilution (Singh, 1999; Janmajay Singh, 2011). Ce résultat contradictoire obtenu dans notre travail, pourrait être dû à une croissance lente causée par le papier filtre qui pourrait ne pas avoir favorisé la croissance des espèces préférant les milieux riches en composants organiques présents dans le milieu PDA. Par ailleurs, certains champignons tels que *T. harzianum*, *R. oryzae*, *B. cinerea*, *A. alternata*, et *C. cladosporioides* n'ont été observés que lors de l'utilisation de la méthode de dilution. C'est ce qui a également été rapporté par (Gohari, 2007; Gacem, 2011).

Nos résultats nous ont également permis de constater que le traitement fongicide réduisait le nombre de flores fongiques des semences, des feuilles et des épis de blé dur. En effet, les graines traitées par le Raxil® 060 FS et les feuilles et épis traités par l'Amistar®Xtra et l'Artea®330EC ont été moins sujettes aux contaminations en comparaison de celles non traitées. Cette efficacité des fongicides triazolés sur la mycoflore des semences, des feuilles et des épis a également été rapportée par Bharat rai, (1997) ; Ezzahiri, (2001) ; Zahri, (2008), Meksem-amara, (2007) et Hennouni, (2012).

La présente étude est une preuve croissante que l'exposition environnementale aux fongicides triazolés entraîne l'apparition des mécanismes de résistances difficiles à éliminer parce que certaines espèces, telles que *A. flavus*, *A. niger*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum* et *T. harzianum* ont pu se développer sur les semences traitées, ce qui pourrait s'expliquer par la résistance de ces espèces aux triazolés. Cette résistance aux triazolés a été rapportée, pour certaines espèces comme *Aspergillus* et *Penicillium* (Florent Morio, (2012) et Hiroshi Hamamoto, (2000).

Les 10 espèces identifiées par MALDI-TOF MS ont également été par PCR séquençage, à l'exception de la souche *A. tubingensis*. En effet, cette dernière a été identifiée, par PCR et par méthode conventionnelle, comme étant *A. niger* alors que la spectroscopie de masse a révélé que cette souche s'apparentait à l'espèce *A. tubingensis*. Ce résultat confirme bien que les *Aspergillus* noires sont difficiles, voire impossible, de les différencier les uns des autres en utilisant des techniques classiques, ce qui est en accord avec les études réalisées par Abarca (2004) et Alcazar-Fuoli (2009). En effet, la capacité de la technologie MALDI-TOF MS utilisée pour identifier un large éventail d'espèces de moisissures a fait l'objet de nombreux travaux ayant pour objectif de faciliter l'identification des espèces fongiques pathologiques (Seng, 2009 ; Cassagne, 2011 ; Gautier, 2016).

## CHAPITRE II : DETERMINATION DU PROFIL DE RESISTANCE

### II.1. Calcul des concentrations minimales inhibitrices (CMF) par technique de diffusion

#### II.1.1. Le Raxil® 060 FS

Selon l'échelle de Kumar *et al* (2007), les doses des fongicides testés sur les différents isolats peuvent être classés en cinq groupes selon leurs pourcentages d'inhibition :

- Le premier groupe renferme les espèces fongiques hautement résistant dont les doses D1, D2 et D3 ont des pourcentages d'inhibition de 11.11%, 13.88%, 30.55% ; 12%, 20%, 36% ; 8.82%, 17.65%, 26.47% ; 5.61%, 8.77%, 12.28% et 15.79, 21.47, 39.58 et ce, pour les espèces *P. griseofulvum*, *P. glabrum*, *A. niger*, *T. harzianium*, *A. alternata* respectivement. *A. flavus* est hautement résistant à D1 et D2 seulement avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 20% et 34.54%.
- Le second groupe est représenté par les isolats résistants dont le pourcentage d'inhibition varie entre 40 et 60%. Il renferme les espèces : *P. glabrum* avec (56%) à la dose D4, et *A. flavus* avec (56.36%) à la dose D3.
- *P. griseofulvum* avec (61.1%) *A. niger* (61.76%), *A. flavus* (69.1%) et *T. harzianium* avec (74.62%) à la dose D4 constituent un troisième groupe intermédiaire des espèces modérément résistantes.
- le quatrième groupe rassemblent les espèces sensibles qui ont des pourcentages d'inhibition entre 75 et 90% telle que *P. griseofulvum* avec (88.88%), *P. glabrum* avec (80%) et *A. niger* avec (88.24%) à D5.
- Le dernier groupe est celui des espèces hautement sensibles qui affichent des pourcentages d'inhibition supérieurs à 90%. Ce groupe est représenté par *Aspergillus flavus* avec (92.73%), *T. harzianium* avec (93.33%) et *A. alternata* avec (98.52%) à la dose D5. De plus, tous les isolats à la dose D6 ont montré un pourcentage d'inhibition de 100% (Tableau 14).

Tableau 14 : Réactions (Sensibilité/Résistance) des six isolats *in vitro* à différentes doses du fongicide testé (Raxil® 060 FS) selon l'échelle de Kumar *et al* (2007).

Isolats	Doses ( $\mu$ l)	Pourcentage d'inhibition (%)	Réactions (Sensibilité/Résistance)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	D1	11.11	HR
	D2	13.88	HR
	D3	30.55	HR
	D4	61.1	MR
	D5	88.88	S
	D6	100	HS
<i>Penicillium glabrum</i>	D1	12	HR
	D2	20	HR
	D3	36	HR
	D4	56	R
	D5	80	S
	D6	100	HS
<i>Aspergillus flavus</i>	D1	20	HR
	D2	34.54	HR
	D3	56.36	R
	D4	69.1	MR
	D5	92.73	HS
	D6	100	HS
<i>Aspergillus niger</i>	D1	8.82	HR
	D2	17.65	HR
	D3	26.47	HR
	D4	61.76	MR
	D5	88.24	S
	D6	100	HS
<i>Trichoderma harzianum</i>	D1	5.61	HR
	D2	8.77	HR
	D3	12.28	HR
	D4	74.62	MR
	D5	93.33	HS
	D6	100	HS
<i>Alternaria alternata</i>	D1	15.79	HR
	D2	21.47	HR
	D3	39.58	HR
	D4	76.21	S
	D5	98.52	HS
	D6	100	HS

L'analyse de la variance (ANOVA) a révélé des différences significatives ( $\alpha < 0.05$ ) entre les six doses de fongicide. Le diamètre moyen de croissance des isolats en fonction des doses de Raxil® 060 FS est représenté dans les figures de 20 à 25

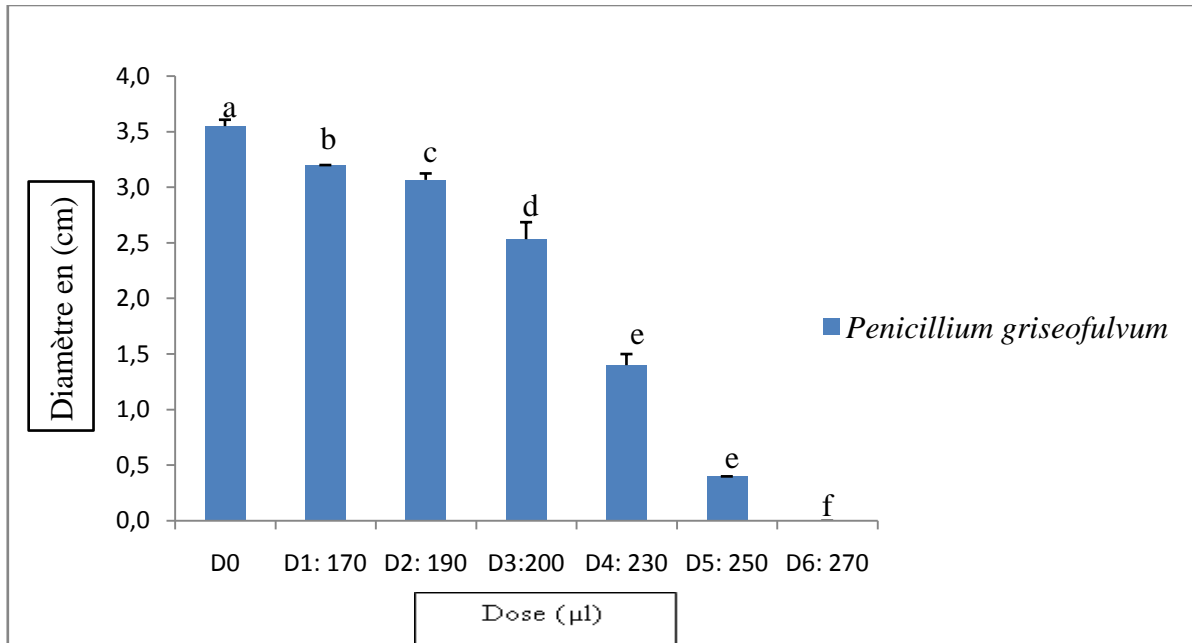


Figure 20 : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium griseofulvum* en fonction des doses de Raxil® 060 FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes)

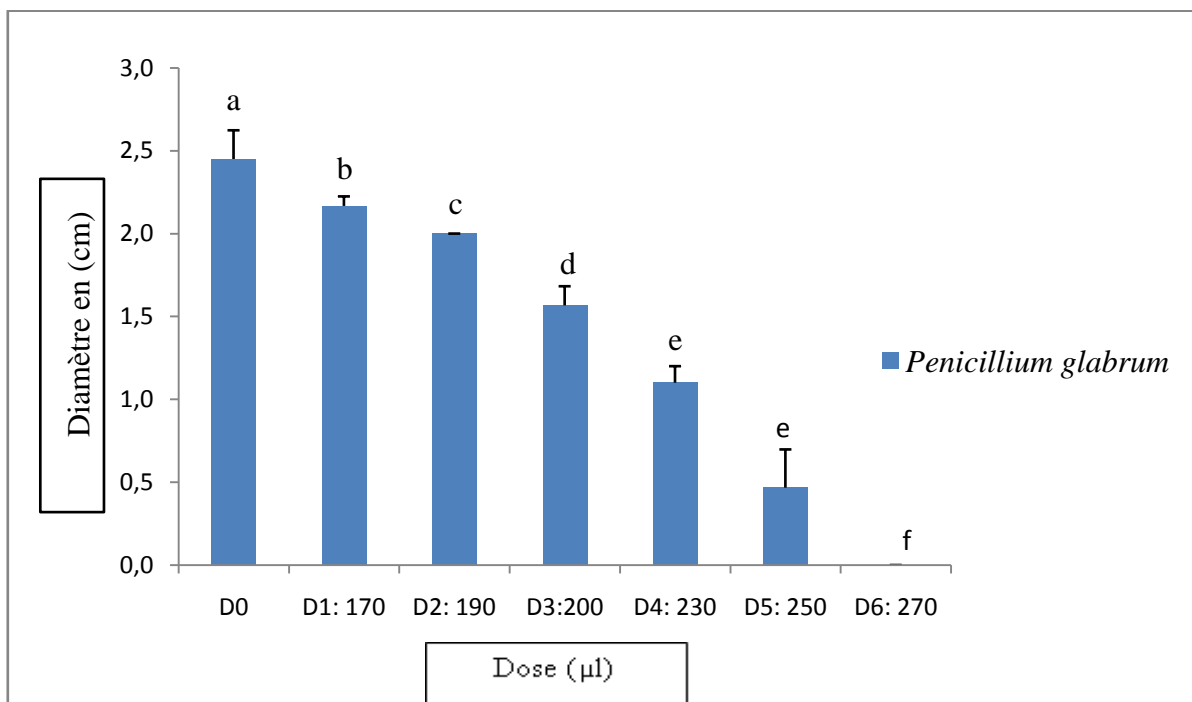


Figure 21 : Diamètre moyen de croissance de *Penicillium glabrum* en fonction des doses de Raxil® 060 FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes)

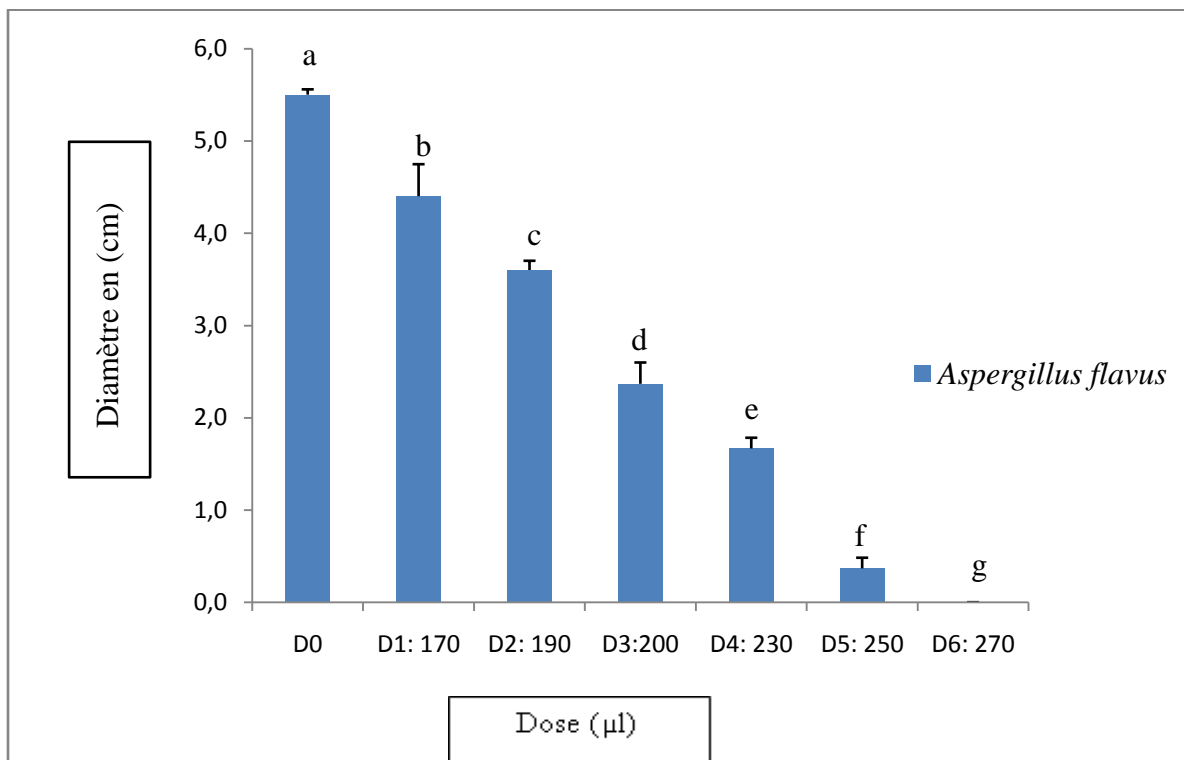


Figure 22: Diamètre moyen de croissance d'*Aspergillus flavus* en fonction des doses de Raxil®060FS

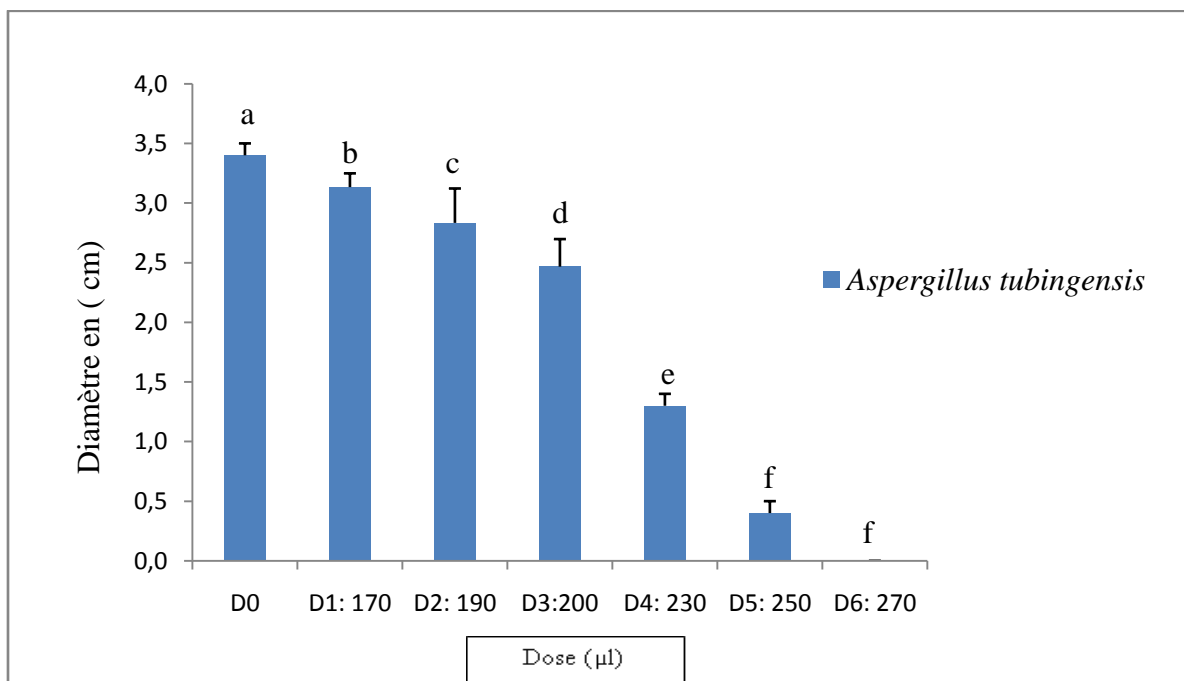


Figure 23: Diamètre moyen de croissance d'*Aspergillus tubingensis* en fonction des doses de Raxil®060FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes)

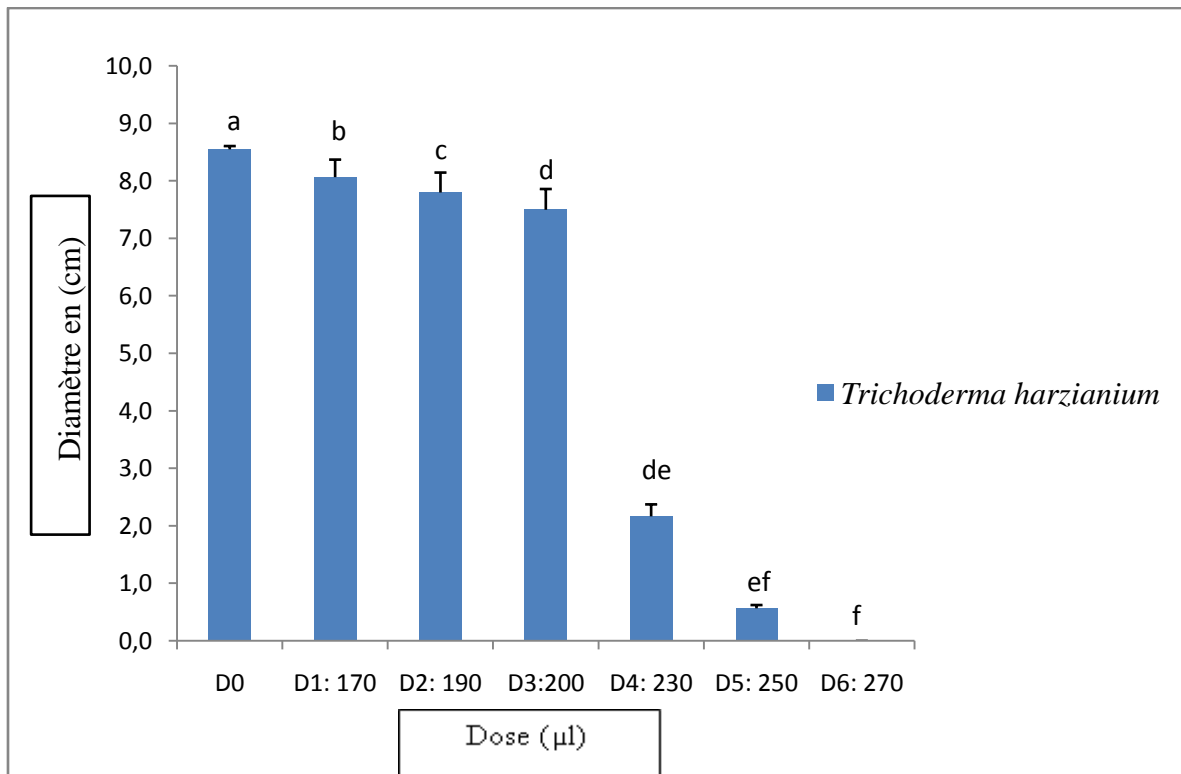


Figure 24: Diamètre moyen de croissance de *Trichoderma harzianium* en fonction des doses de Raxil® 060 FS

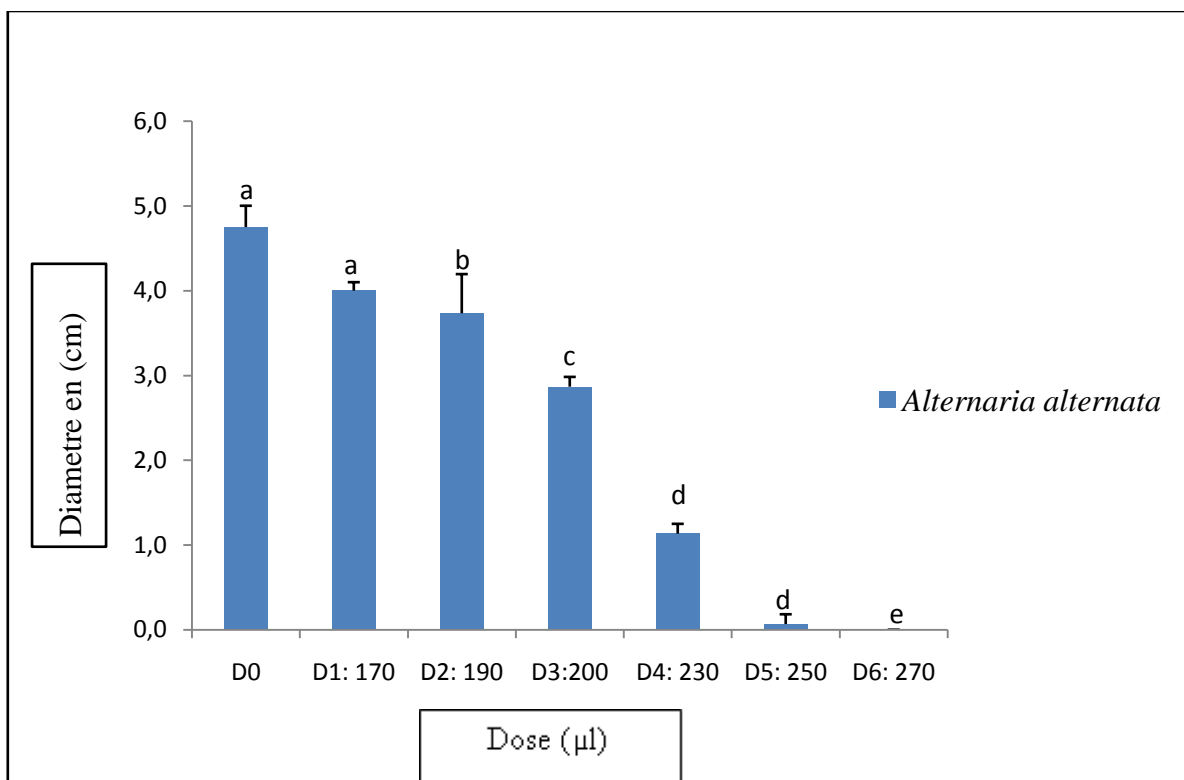


Figure 25: Diamètre moyen de croissance d'*Alternaria alternata* en fonction des doses de Raxil® 060 FS (les barres portant la même lettre ne sont pas significativement différentes)

### II.1.2. L'Amistar® Xtra

Les doses de L'Amistar® Xtra testé nous permettent de classer les différents isolats selon leurs pourcentages d'inhibition en :

-Espèces fongiques hautement résistant (HR) dont les doses D1et D2 ont des pourcentages d'inhibition de (23.52,11%, 38.23%), (22.72%, 36.36%) pour *P. griseofulvum* et *P. glabrum*. *T. harzianium* et *A. alternata* ont des pourcentages d'inhibition de (14.11%,17.64%, 22.35%), (22.22%, 26.66%, 33.33%) à D1, D2 et D3 respectivement.

-Espèces fongiques résistantes (R) représentées par *P. griseofulvum* et *P. glabrum* à la dose D3 seulement avec des pourcentages d'inhibition de 44.11% et 50%.

- Espèces fongiques modérément résistantes (MR) qui ont un pourcentage d'inhibition entre 60 et 75%, elles sont représentées par les espèces : *P. griseofulvum* avec (70.58%) *P. glabrum* (63.63%) *T. harzianium* (63.52%) et *A. alternata* avec (71.11%) à la dose D4.

-Espèces fongiques sensibles représentées seulement par *A. alternata* à D5 avec un pourcentage d'inhibition de 86.66%.

-Espèces fongiques hautement sensibles (HS): ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 90%, elles renferment les espèces *P. griseofulvum* avec (98.23%, 100%), *P. glabrum* avec (97.27% ,100%), *T. harzianium* avec (94.1%, 100%) à D5 et D6 et *A. alternata* à D6 avec 100% d'inhibition (Tableau 15).

Tableau 15 : Réactions (Sensibilité/Résistance) des quatre isolats *in vitro* à différentes doses de fongicide testé (Amistar®Xtra) selon l'échelle de Kumar *et al* (2007).

Isolats	Doses ( $\mu$ l)	Pourcentage d'inhibition (%)	Réactions (Sensibilité/Résistance)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	D1	23.52	HR
	D2	38.23	HR
	D3	44.11	R
	D4	70.58	MR
	D5	98.23	HS
	D6	100	HS
<i>Penicillium glabrum</i>	D1	22.72	HR
	D2	36.36	HR
	D3	50	R
	D4	63.63	MR
	D5	97.27	HS
	D6	100	HS
<i>Trichoderma harzianum</i>	D1	14.11	HR
	D2	17.64	HR
	D3	22.35	HR
	D4	63.52	MR
	D5	94.1	HS
	D6	100	HS
<i>Alternaria alternata</i>	D1	22.22	HR
	D2	26.66	HR
	D3	33.33	HR
	D4	71.11	MR
	D5	86.66	S
	D6	100	HS

L'analyse de la variance (ANOVA) a révélé des différences significatives entre les six doses de fongicide. Le diamètre moyen de croissance des isolats en fonction des doses de L'Amista®r Xtra est représenté dans les figures de 26 à 29.



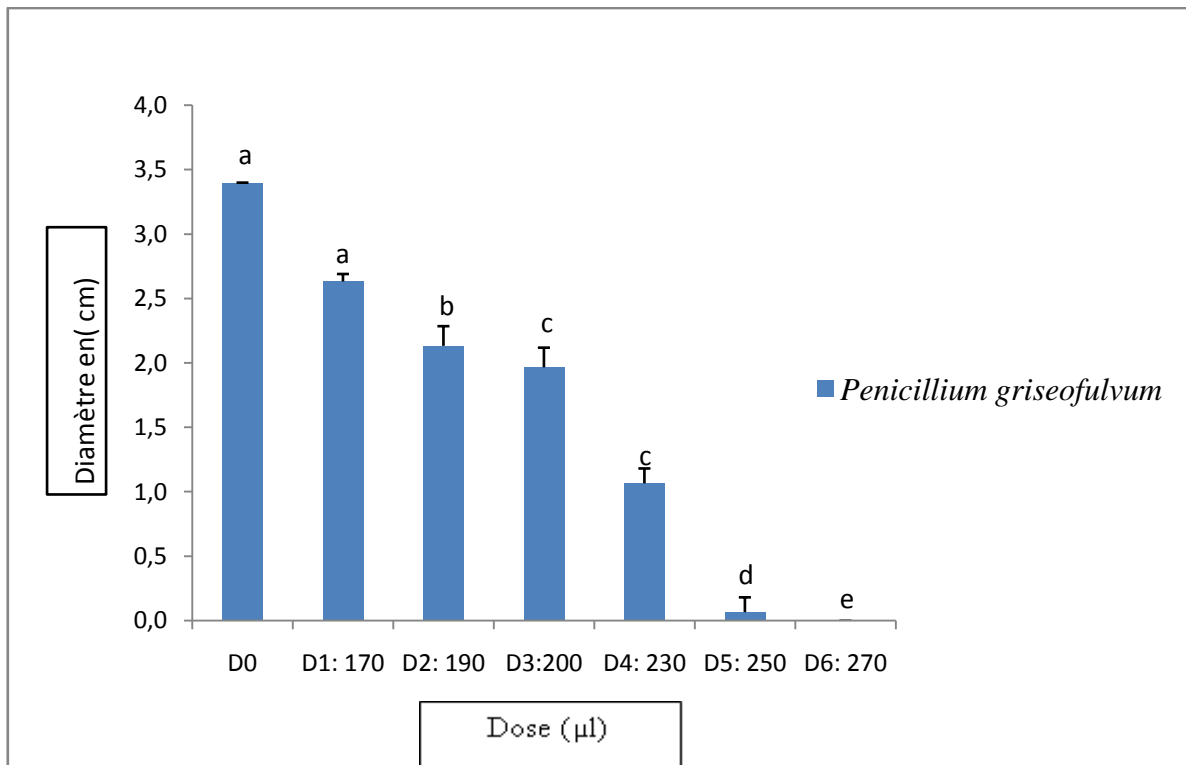


Figure 26: Diamètre moyen de croissance de *Penicillium griseofulvum* en fonction des doses de l'Amistar®Xtra

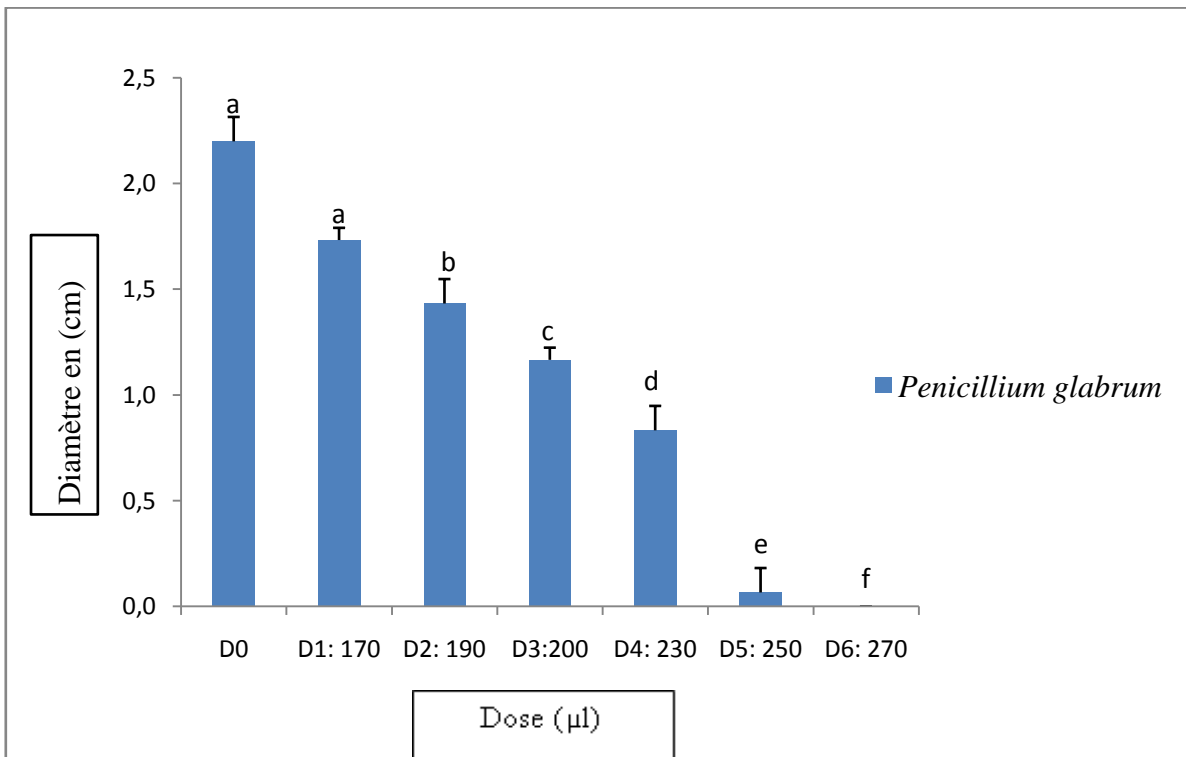


Figure 27: Diamètre moyen de croissance de *Penicillium glabrum* en fonction des doses de l'Amistar®Xtra

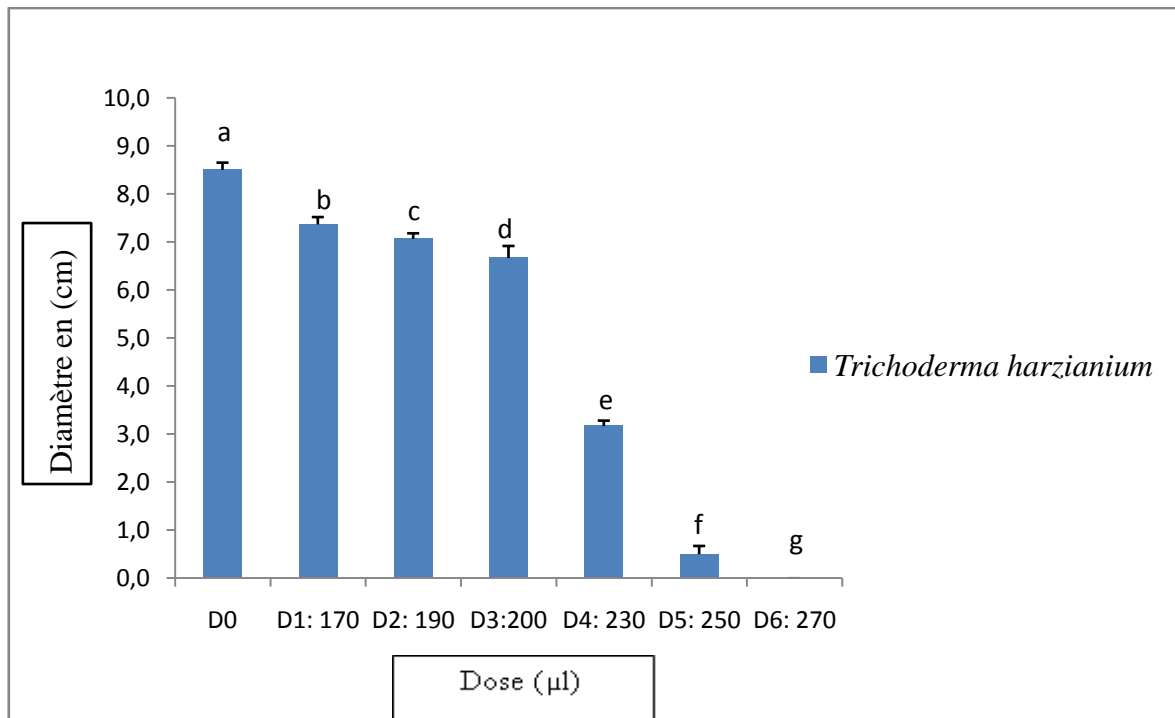


Figure 28: Diamètre moyen de croissance de *Trichoderma harzianium* en fonction des doses de l'Amistar®Xtra

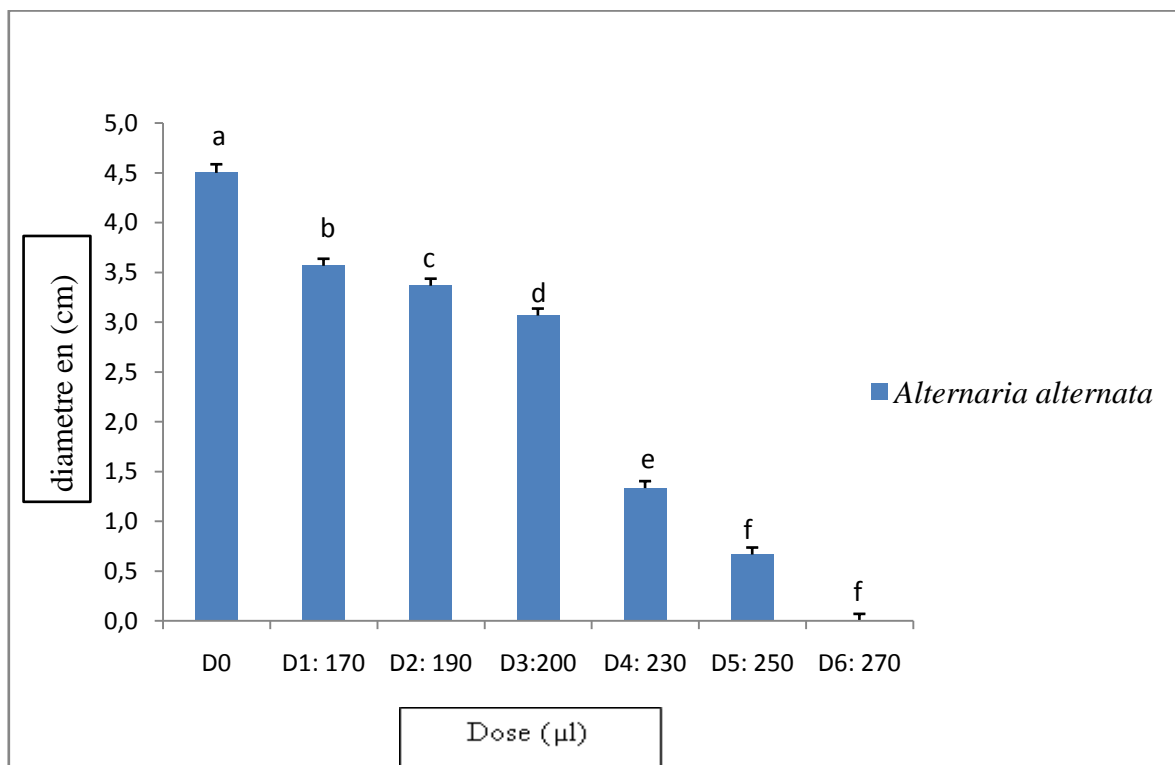


Figure 29: Diamètre moyen de croissance d'*Alternaria alternata* en fonction des doses de l'Amistar®Xtra

### II.1.3. L'Artea® 330EC

Toujours selon l'échelle de Kumar *et al* (2007), les doses de l'Artea® 330EC appliqués sur les différents isolats a permis de classer les espèces fongiques en:

-Espèces hautement résistantes qui ont un pourcentage d'inhibition inférieur à 40% représentées par *P. griseofulvum*, *P. glabrum* et *A. alternata* à la dose D1 et *T. harzianium* aux doses D1, D2 et D3 avec des pourcentages d'inhibitions respectifs de 38.88%, 34.78% , 36.17% et 19.04%, 28.57%, 29.76%.

-Espèces fongiques résistantes aux doses D2 et D3 ; représentées par *P. griseofulvum* (44.44%,58.33), *P. glabrum* (47.82%, 56.52%) et *A. alternata* (42.55%, 51.06%) respectivement.

- Espèces fongiques modérément résistantes regroupant *P. glabrum* (73.91%) *T. harzianium* (71.42%) et *A. alternata* avec (72.34%) à la dose D4.

-Espèces fongiques sensibles représentés seulement par *P. griseofulvum* à la dose D4 avec un pourcentage d'inhibition de 83.33%.

-Espèces fongiques hautement sensible représentées par *P. griseofulvum* avec (91.66%, 100%), *P. glabrum* avec (95.65% ,100%), *T. harzianium* avec (97.61%, 100%) et *A. alternata* avec (93.61%, 100%) à D5 et D6 (Tableau 16).

Tableau 16 : Réactions (Sensibilité/Résistance) des quatre isolats *in vitro* à différentes doses de fongicide testé (l'Artea®330EC) selon l'échelle de Kumar *et al* (2007).

Isolats	Doses ( $\mu$ l)	Pourcentage d'inhibition (%)	Réactions (Sensibilité/Résistance)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	D1	38.88	HR
	D2	44.44	R
	D3	58.33	R
	D4	83.33	S
	D5	91.66	HS
	D6	100	HS
<i>Penicillium glabrum</i>	D1	34.78	HR
	D2	47.82	R
	D3	56.52	R
	D4	73.91	MR
	D5	95.65	HS
	D6	100	HS
<i>Trichoderma harzianum</i>	D1	19.04	HR
	D2	28.57	HR
	D3	29.76	HR
	D4	71.42	MR
	D5	97.61	HS
	D6	100	HS
<i>Alternaria alternata</i>	D1	36.17	HR
	D2	42.55	R
	D3	51.06	R
	D4	72.34	MR
	D5	93.61	HS
	D6	100	HS

L'analyse de la variance (ANOVA) a révélé des différences significatives entre les six doses de fongicide. Le diamètre moyen de croissance des isolats en fonction des doses de L'Artea®330EC est illustré par les figures 30 à 33

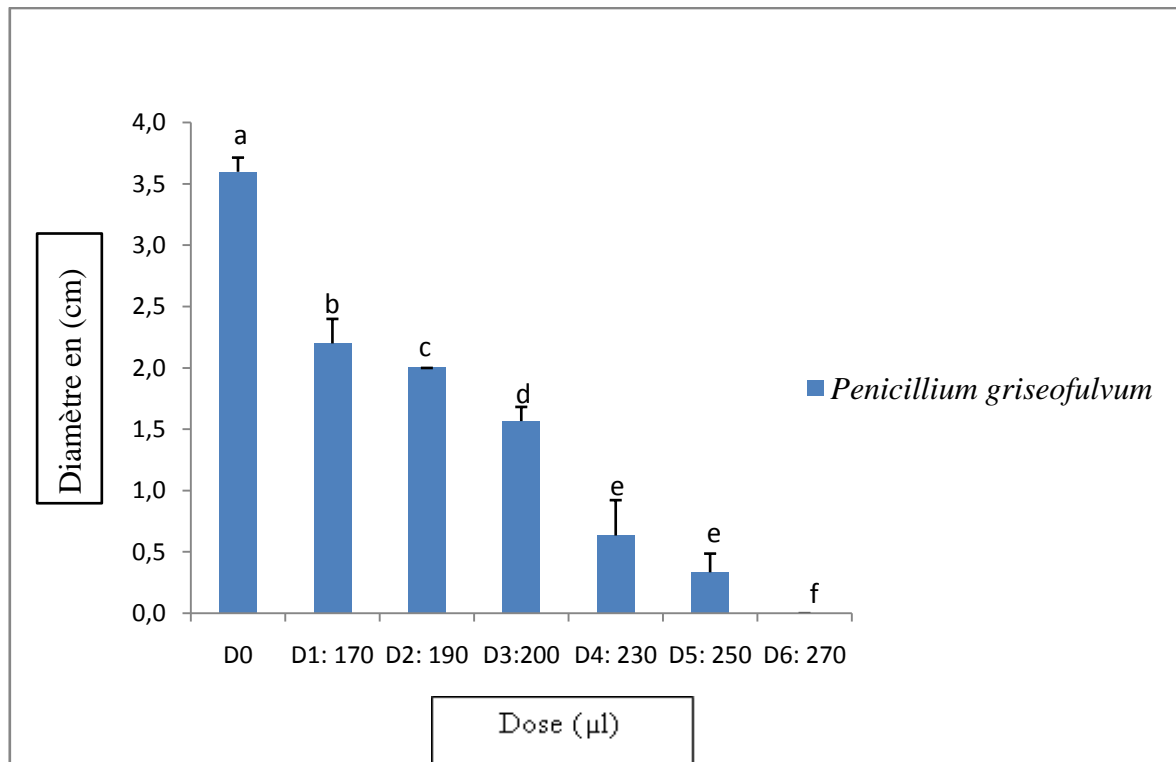


Figure 30: Diamètre moyen de croissance de *Penicillium griseofulvum* en fonction des doses de l'Arte@330EC

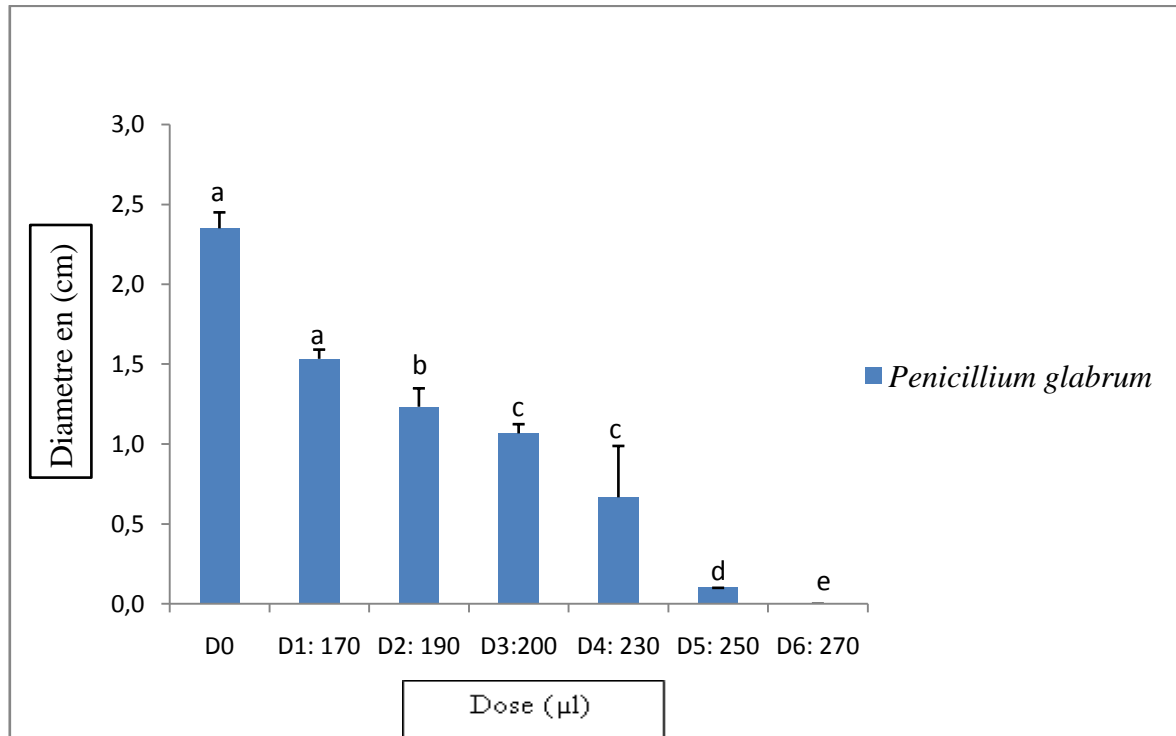


Figure 31: Diamètre moyen de croissance de *Penicillium glabrum* en fonction des doses de l'Arte@330EC.

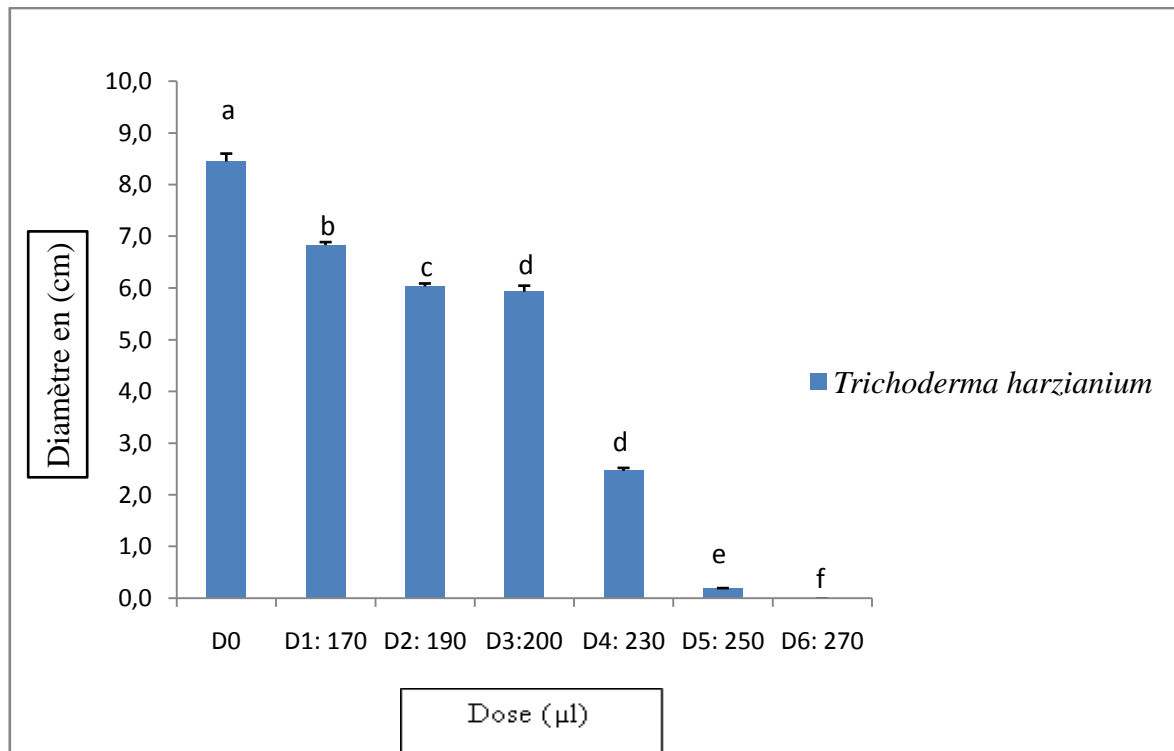


Figure 32: Diamètre moyen de croissance de *Trichoderma harzianium* en fonction des doses de l'Artea® 330EC

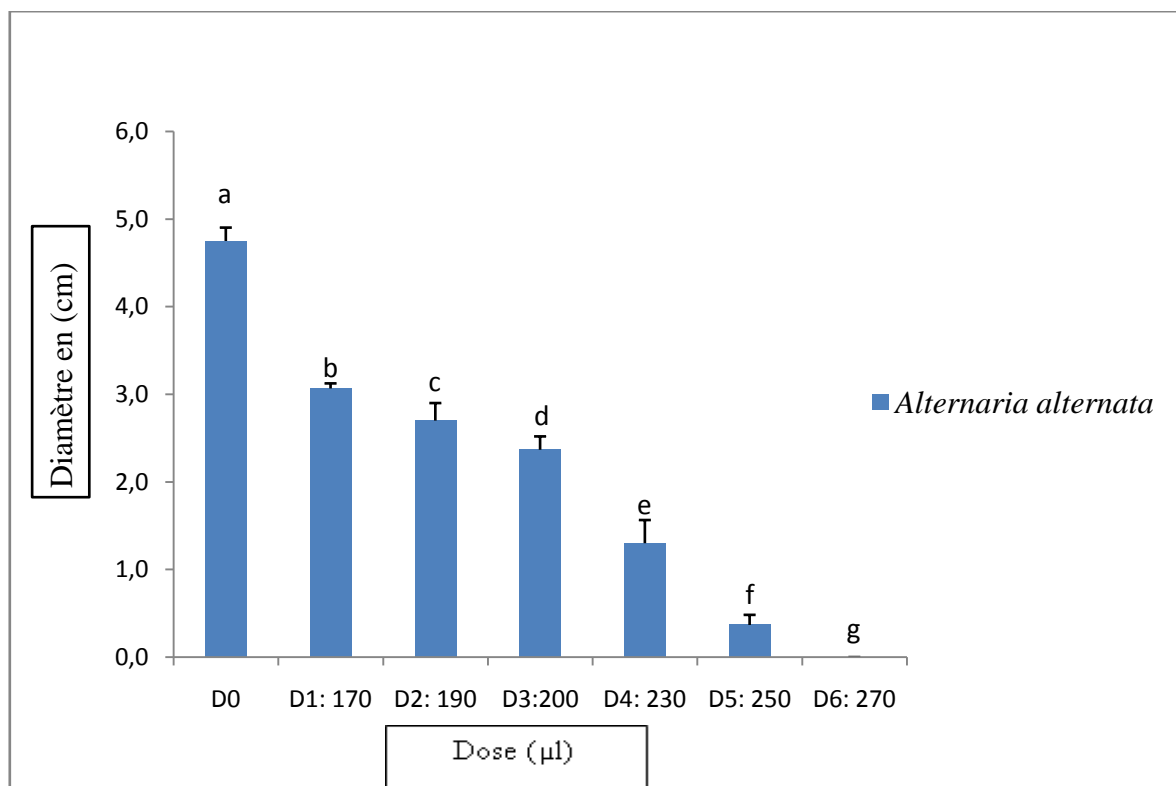


Figure 33: Diamètre moyen de croissance d'*Alternaria alternata* en fonction des doses de l'Artea® 330EC.

L'action des trois fongicides étudiés sur la croissance *in vitro* des isolats a permis de nous donner les résultats suivants.

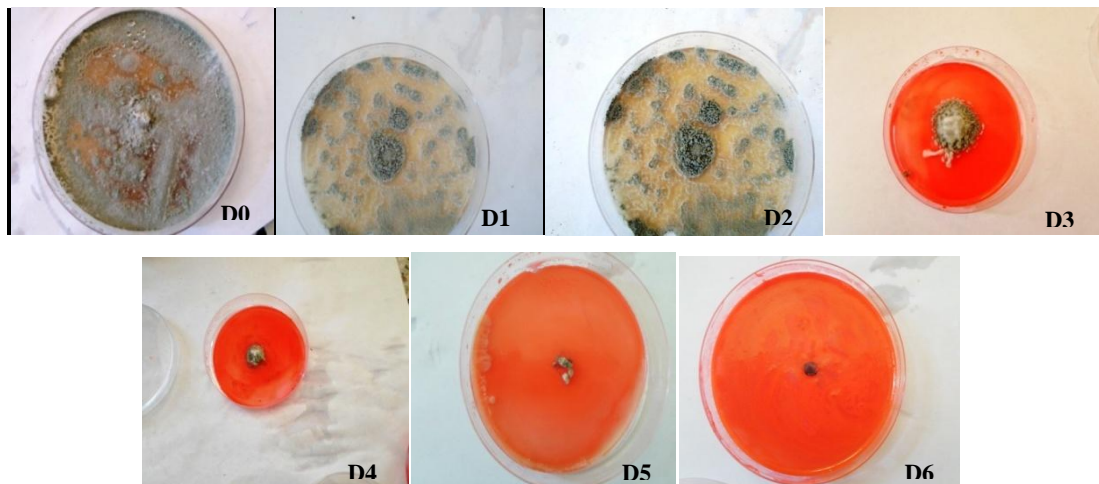
➤ Le Raxil®060 FS :

Le diamètre moyen de croissance mycélienne pour chacune des doses de D1a D6 a été estimé et représenté dans le tableau 17. Il varie d'une dose à l'autre. Il en ressort que l'action est significative à partir de la concentration D3 (Figure34).

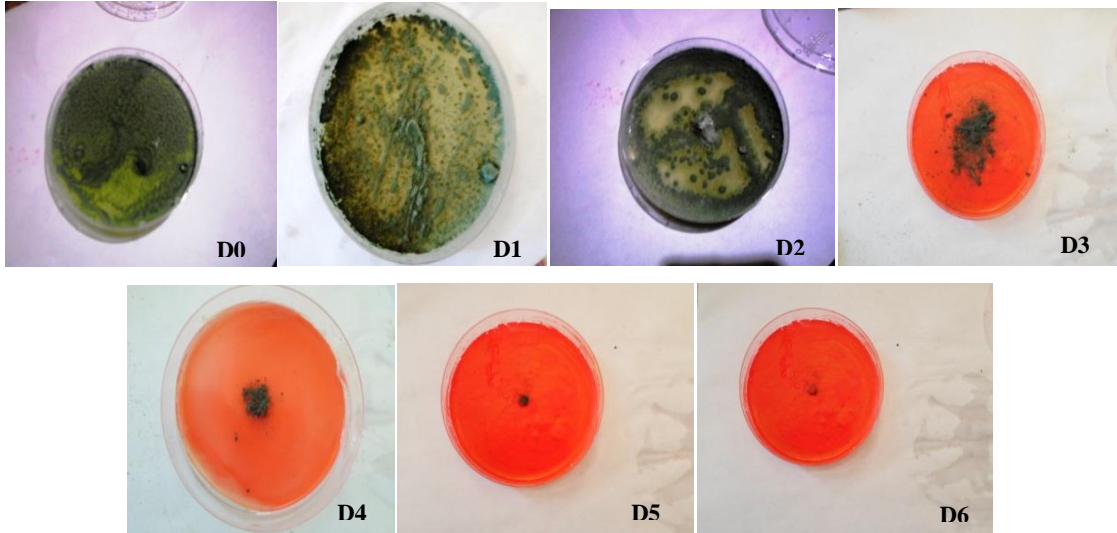
Tableau 17 : Diamètre de croissance des 6 souches isolées sur milieu PDA additionné du Raxil®060 FS après 10 jours d'incubation à 28 °C.

Dose \ Souche	Diamètre (mm) pour D0	Diamètre (mm) pour D1	Diamètre (mm) pour D2	Diamètre (mm) pour D3	Diamètre (mm) pour D4	Diamètre (mm) pour D5	Diamètre (mm) pour D6
Penicillium griseofulvum	3.6	3.2	3.1	2.5	1.4	0.4	0.0
Penicillium glabrum	2.5	2.2	2.0	1.6	1.1	0.5	0.0
Aspergillus flavus	5.5	4.4	3.6	2.4	1.7	0.4	0.0
Aspergillus tubingensis	3.4	3.1	2.8	2.5	1.3	0.4	0.0
Trichoderma harzianum	8.55	8.07	7.80	7.50	2.17	0.57	0.0
Alternaria alternata	4.75	4.0	3.73	2.87	1.13	0.07	0.0

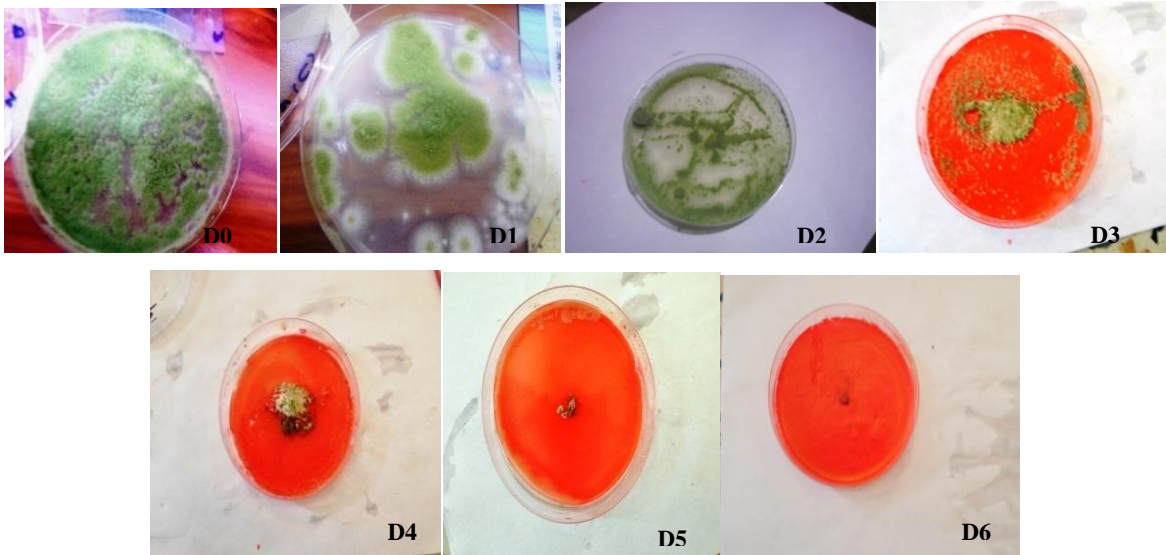
*Penicillium griseofulvum*



*Penicillium glabrum*

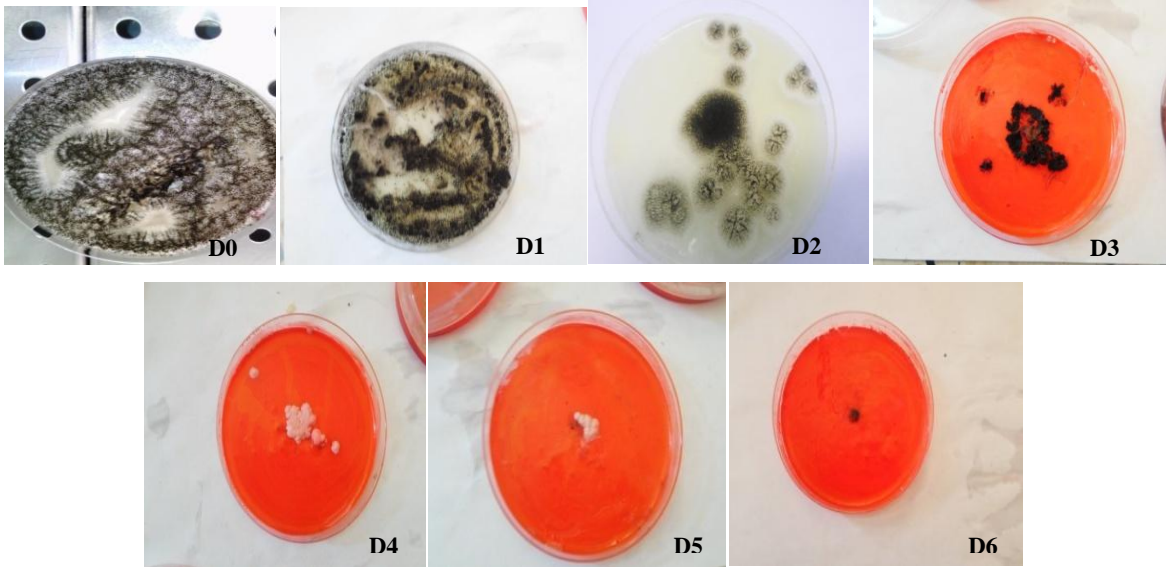


*Aspergillus flavus*

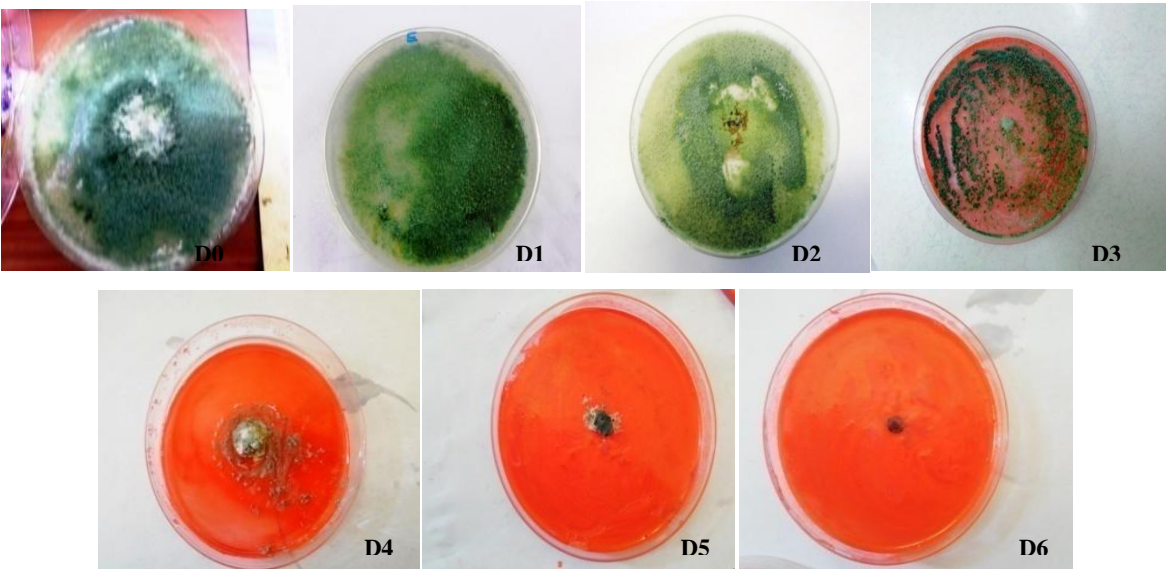




*Aspergillus tubingensis*



*Trichoderma harzianum*



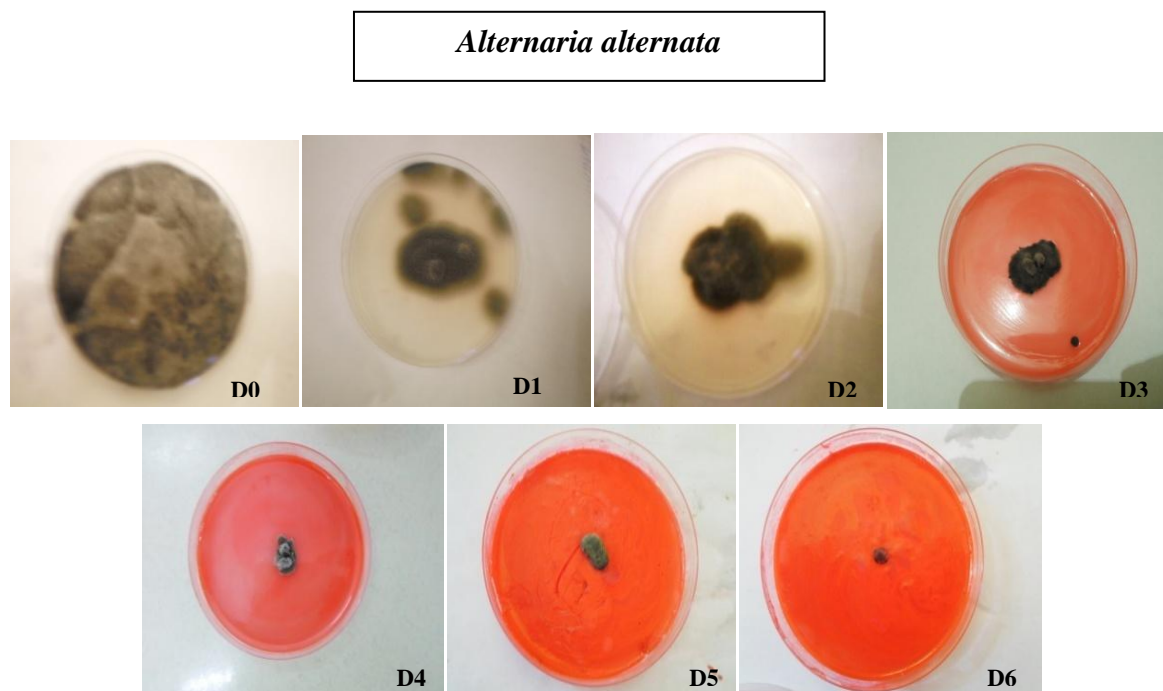


Figure 34 : Action de Raxil®060 FS sur la croissance mycélienne de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium glabrum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* sur le milieu PDA amandé au fongicide et sans fongicide (Témoin).

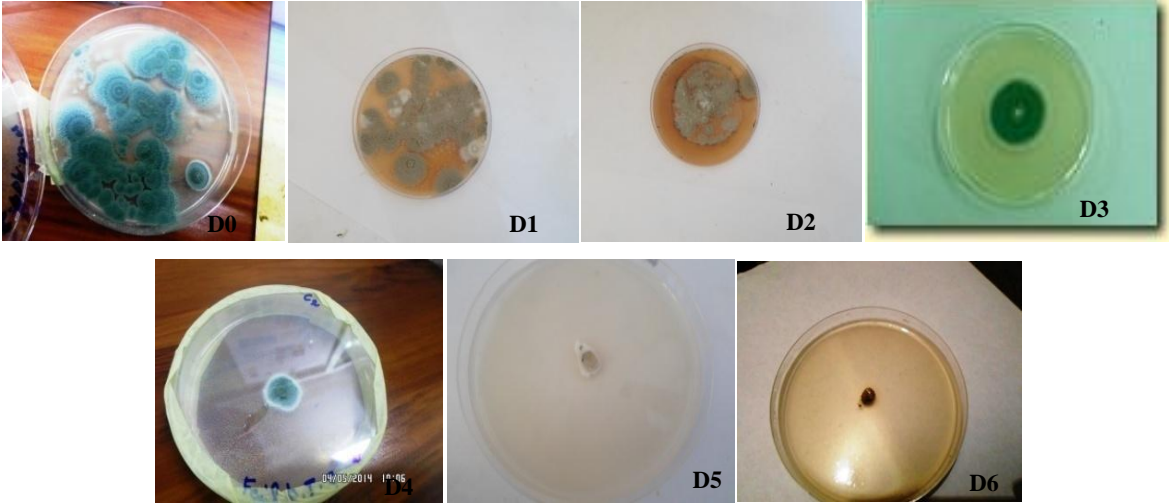
➤ Amistar® Xtra :

Le diamètre moyen de croissance mycélienne pour chacune des doses de D1 à D6 a été estimé et représenté dans le tableau 18. Ce dernier démontre que l'action est significative à partir de la concentration D3 (Figure 35).

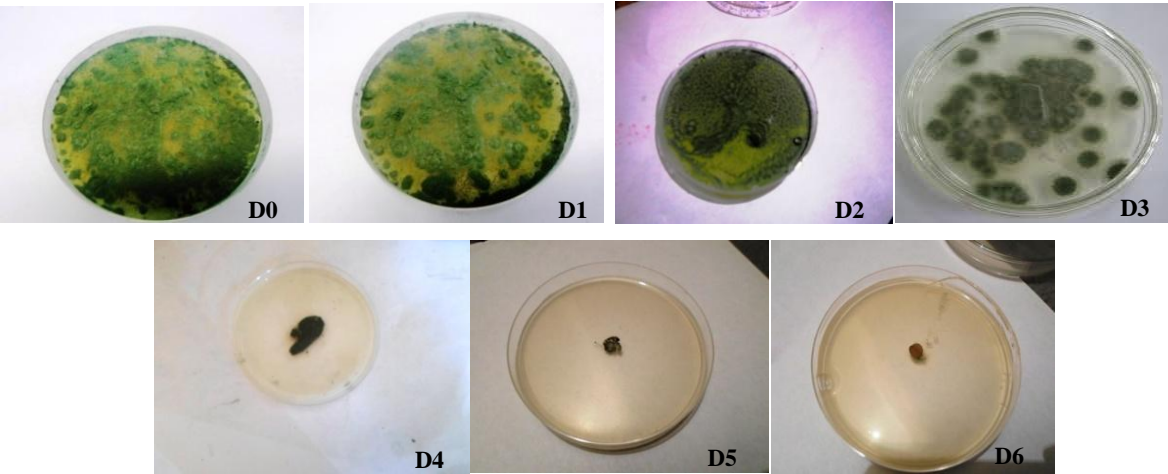
Tableau 18 : Diamètre de croissance des 4 souches isolées sur milieu PDA additionné de L'Amistar® Xtra après 10 jours d'incubation à 28 °C.

Dose / Souche	Diamètre (mm) pour D0	Diamètre (mm) pour D1	Diamètre (mm) pour D2	Diamètre (mm) pour D3	Diamètre (mm) pour D4	Diamètre (mm) pour D5	Diamètre (mm) pour D6
<i>Penicillium griseofulvum</i>	3.5	2.6	2.1	1.9	1.0	0.6	0.0
<i>Penicillium glabrum</i>	2.2	1.7	1.4	1.1	0.8	0.06	0.0
<i>Trichoderma harzianum</i>	8.5	7.3	7.0	6.6	3.1	0.5	0.0
<i>Alternaria alternata</i>	4.5	3.4	3.3	3.06	1.33	0.6	0.0

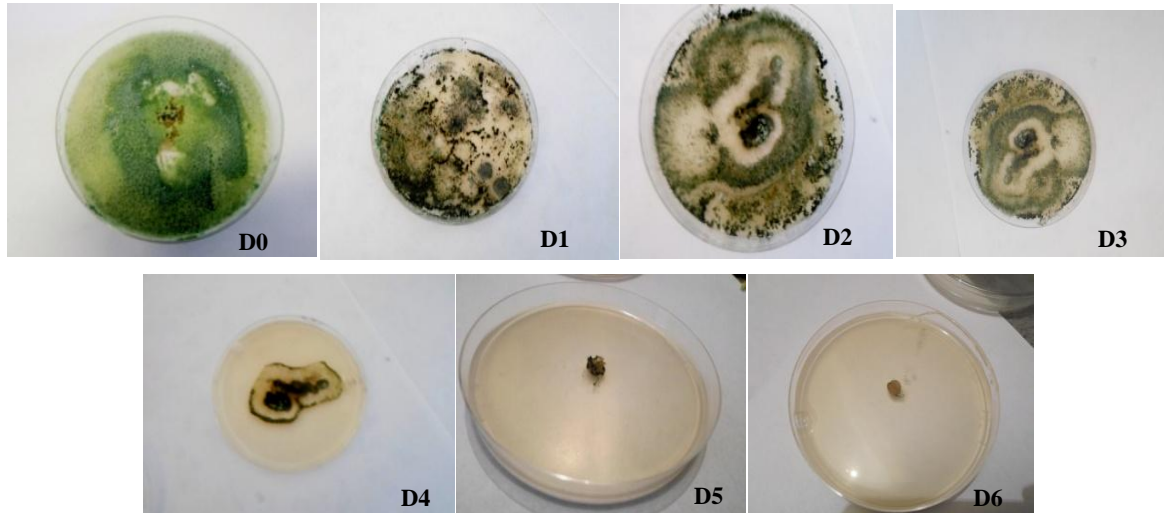
*Penicillium griseofulvum*



*Penicillium glabrum*



*Trichoderma harzianum*



*Alternaria alternata*

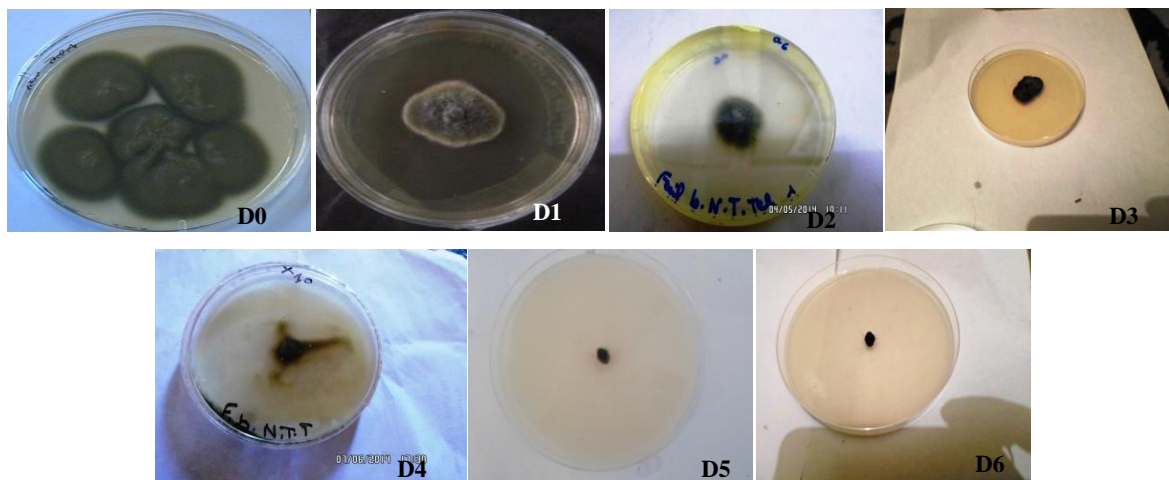


Figure 35 : Action de l'Amistar®Xtra sur la croissance mycélienne de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium glabrum*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* sur le milieu PDA amandé au fongicide et sans fongicide (Témoin).

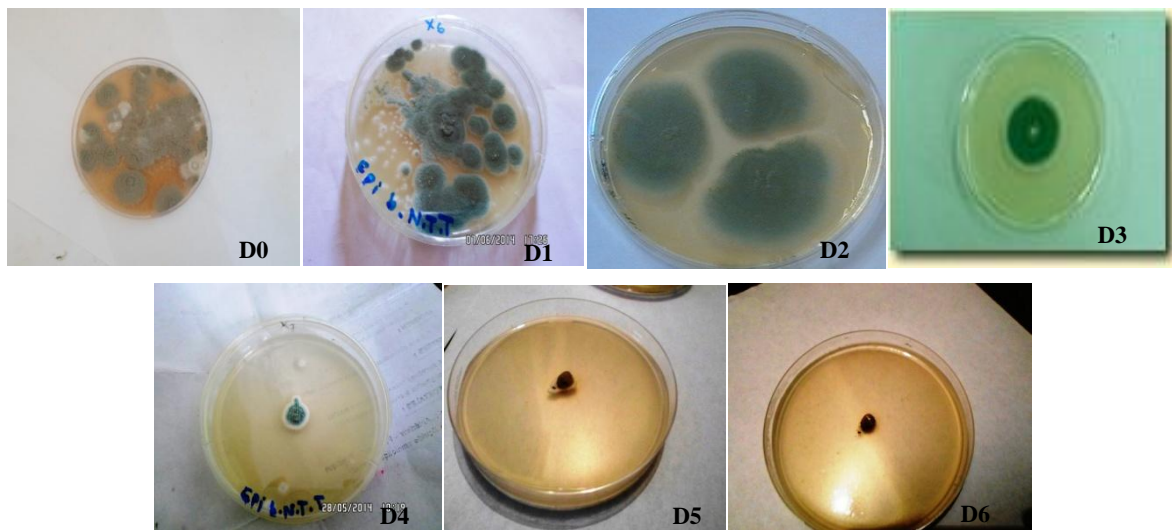
➤ Artea®330EC:

Le diamètre moyen de croissance mycélienne pour chacune des doses de D1a D6 a été estimé et représenté dans le tableau ci dessous. L'action est significative à partir de la concentration D3 (Figure36).

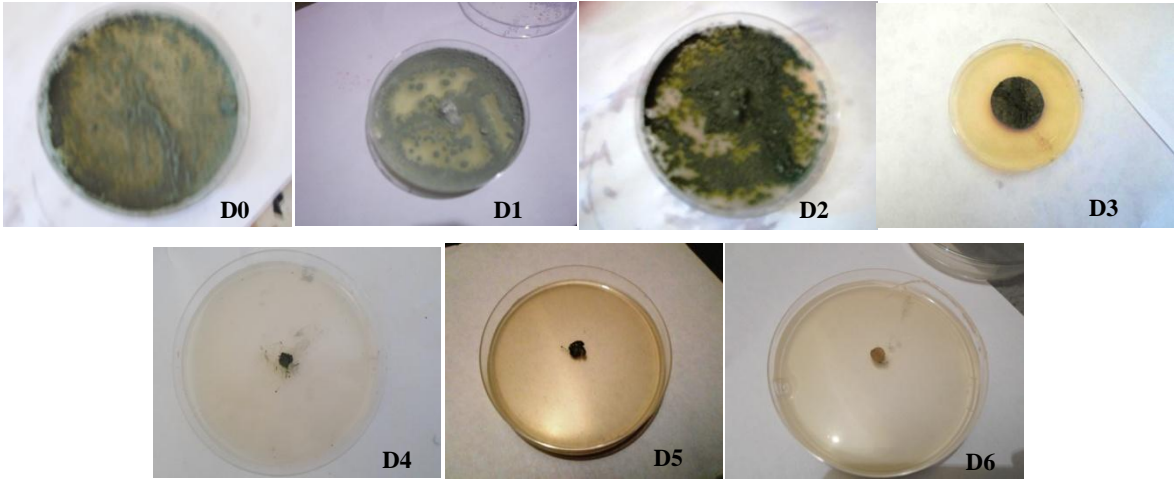
**Tableau 19** : Diamètre de croissance des 4 souches isolées sur milieu PDA additionné de L'Artea®330EC après 10 jours d'incubation à 28 °C.

Dose Souche	Diamètre (mm) pour D0	Diamètre (mm) pour D1	Diamètre (mm) pour D2	Diamètre (mm) pour D3	Diamètre (mm) pour D4	Diamètre (mm) pour D5	Diamètre (mm) pour D6
Penicillium griseofulvum	3.6	2.2	2.1	1.5	0.6	0.3	0.0
Penicillium glabrum	2.3	1.5	1.2	1.0	0.6	0.1	0.0
Trichoderma harzianum	8.4	6.8	6.0	5.9	2.4	0.2	0.0
Alternaria alternata	4.7	3.0	2.7	2.3	1.3	0.3	0.0

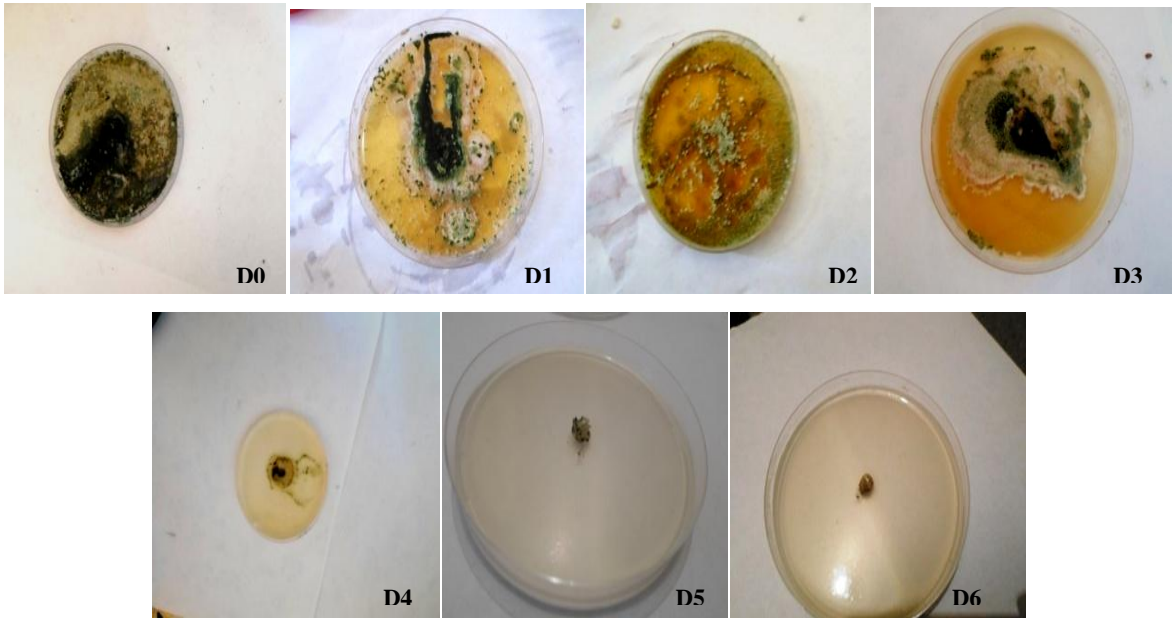
*Penicillium griseofulvum*



*Penicillium glabrum*



*Trichoderma harzianum*



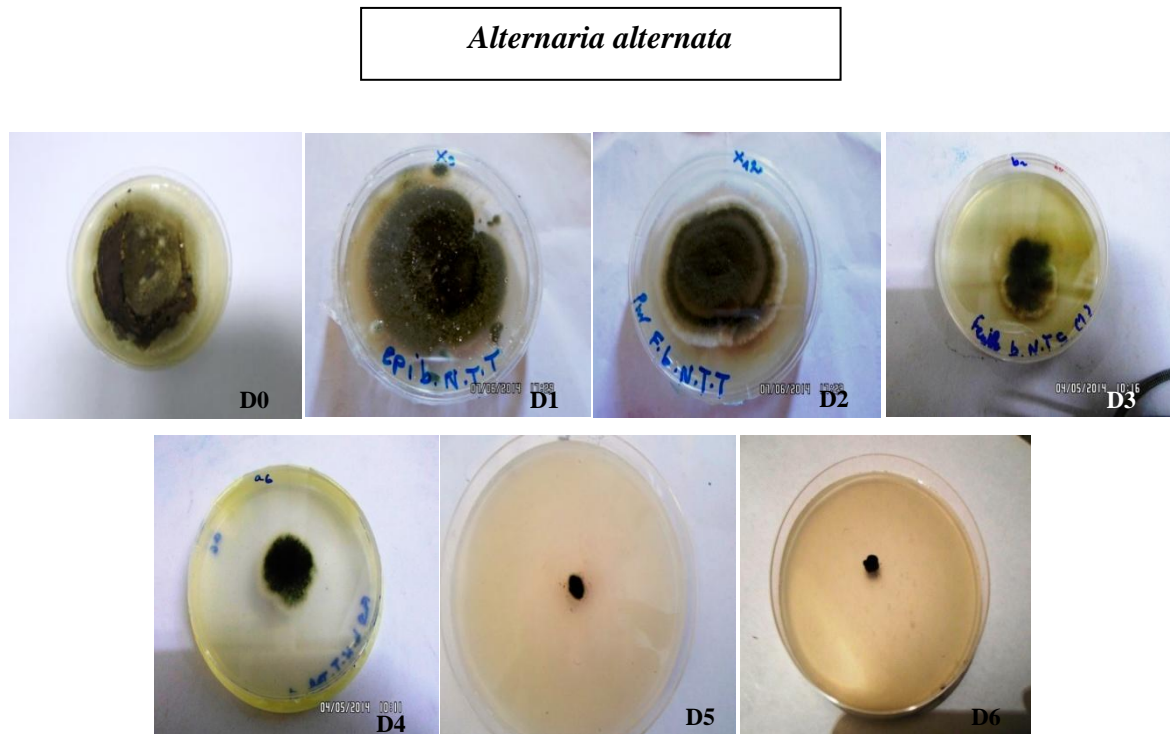


Figure 36 : Action de l'Artea® 330EC sur la croissance mycélienne de *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium glabrum*, *Trichoderma harzianum* et *Alternaria alternata* sur le milieu PDA amandé au fongicide et sans fongicide (Témoin).

## II.2. Discussion

Les essais réalisés au cours des deux campagnes 2013-2014 et 2014-2015, avec les triazolés seuls ou combinés au Azoxystrobine, un dérivé de la famille des strobilurines, ont mis en évidence l'intérêt de ces fongicides pour lutter contre les pathogènes du blé dur 'GTA'. Un traitement des semences, plus deux applications au champ, au stade montaison et au stade floraison, ont permis d'obtenir une bonne protection avec une réduction considérable des pathogènes. Cette amélioration de l'état sanitaire va assurer une augmentation du rendement du blé.

Les triazoles testés (Raxil®060 FS Artea®330EC et Amistar®Xtra) ont entraîné une diminution importante du développement des filamenteux. Ceci confirme que les triazoles inhibent la biosynthèse des stérols, constituants essentiels des champignons, en bloquant la C14-  $\alpha$  -déméthylase. Ce résultat est en accord avec celui de Darmedru, (1994) et Zahri,

(2008). Les matières actives, tébuconazole, Azoxystrobine + cyproconazole, cyproconazole + propiconazole contenu dans le Raxil®060 FS, l'Amistar®Xtra et l'Artea®330EC, ont été prouvées comme étant efficaces contre les mycètes pathogènes des céréales dans les travaux de nombreux auteurs (Sawinska et Małecka, 2007 ; (Zahri, 2008 ; Hennouni, 2012).

Les trois fongicides étudiés agissent différemment sur la croissance *in vitro* des isolats résistants aux traitements. Les deux derniers, Artea®330EC et Amistar®Xtra réduisent considérablement la croissance des isolats (quatre souches résistantes) par rapport au Raxil® 060 FS (six souches résistantes), cependant l'Artea®330EC est plus efficace que l'Amistar® Xtra. En effet, les pourcentages d'inhibition dus à l'Artea®330EC sont supérieurs à ceux de l'Amistar® Xtra (Tableaux 13 et 14). Cela révèle une hypersensibilité des champignons vis-à-vis de l'Artea®330EC et une sensibilité relative à l'Amistar®Xtra. Donc les résultats les plus satisfaisants sont obtenus par l'association des triazolés ou triazolés au strobilurines, fongicide de famille différente avec un mode d'action différent. Les champignons sont alors affectés à différents sites biochimiques et différents stades de développement (Beck, 1995) et risquent moins de développer une résistance (Kosman, 1996). Nos résultats montrent que les combinaisons de triazolés sont plus efficaces que les associations entre fongicides de familles différentes. Cependant, d'autres auteurs ont prouvés l'inverse (Gisi, 1996 ; Zahri, 2008). Ce résultat contradictoire obtenu dans notre travail permet de confirmer l'efficacité des azolés contre les pathogènes des céréales par rapport aux autres fongicides ce qui est prouvé par Meksem-amara (2007) et Hennouni, (2012). Alors que jusqu'à nos jours ; l'histoire de la protection fongicide des céréales va donc continuer à s'écrire avec les triazoles.

Les niveaux de résistance ou de sensibilité des isolats varient pour chaque fongicide en fonction des concentrations. Les résultats relatifs aux différents diamètres des colonies montrent une baisse significative observée suite aux traitements avec les trois produits fongiques par rapport aux témoins. Cependant, à faibles doses (D1, D2) les trois fongicides utilisés affectent faiblement ce paramètre. Ce qui est en corrélation avec les travaux de Hennouni (2012).

Le test de comparaison des moyennes pour les différentes doses appliquées confirme que l'application de la dose la plus élevée de fongicide (D6) constitue un groupe à part par rapport aux autres groupes puisque c'est celle qui a affiché le plus fort impact sur le taux de développement. Le témoin constitue également un groupe différent. Au niveau de chaque fongicide, les barres portant la même lettre (a, b, c, d, e, f ou g) appartenant au même groupe donc ils ne sont pas significativement différentes ( $\alpha=0,05$ ) ceci est en accord avec les travaux



de (Koffi, 2009). Par ailleurs ces trois fongicides sont classés parmi les fongicides utilisés pour le traitement des champignons du blé. Bien que ces fongicides aient réduit la croissance des champignons cependant, à faible doses (D1, D2, D3, D4) aucun des trois fongicides n'a permis d'avoir 100% d'inhibition. Cela pourrait expliquer le développement avec le temps de souches résistantes à ces fongicides. La différence au niveau de la sensibilité des pathogène aux fongicides testés peut être attribuée au fait que le produit chimique Raxil®060 FS est beaucoup plus utilisé par les agriculteurs en tant que « traiteur de semences ». En effet, suite à un usage prolongé, la sensibilité des champignons vis-à-vis du produit aurait diminué et une résistance potentielle pourrait ainsi se développer.

## CHAPITRE III : DETECTION DES MUTATIONS DE RESISTANCE SUR LE GENE *CYP51A*

### III.1. Séquençage de *cyp51A*

L'ensemble du gène *cyp51A* des six isolats résistants a été séquençé pour identifier le mécanisme responsable de la résistance. On a essayé avec 3 couples d'amorces définies pour *fumigatus*.

- le couple pour la région promotrice n'a donné des résultats que pour les témoins *A.fumigatus*, *T. harzianum* et *A.alternata*
- le couple pour la région *cds1* a le mieux marché. Toutes les souches ont été amplifiées. Au niveau du séquençage, pour *A.fumigatus*, on obtient des séquences de 1270pb, pour *P.griseofulvum* et *P.glabrum*, on a une belle séquence, mais de seulement 282-363pb; pour *A. flavus*, et *A. niger*, on a des séquences plus longues environ (600pb), mais pas pures; pour *T. harzianum*, on a une séquence de 86pb et pour *A. alternata*, un échec de séquençage malgré une première PCR positive (identification de l'espèce)
- le couple pour la région *cds2* n'a amplifié que les *fumigatus* (Figure 37).

Les séquences brutes ainsi que la forme fasta de toutes les espèces est représentées dans l'annexe 4.

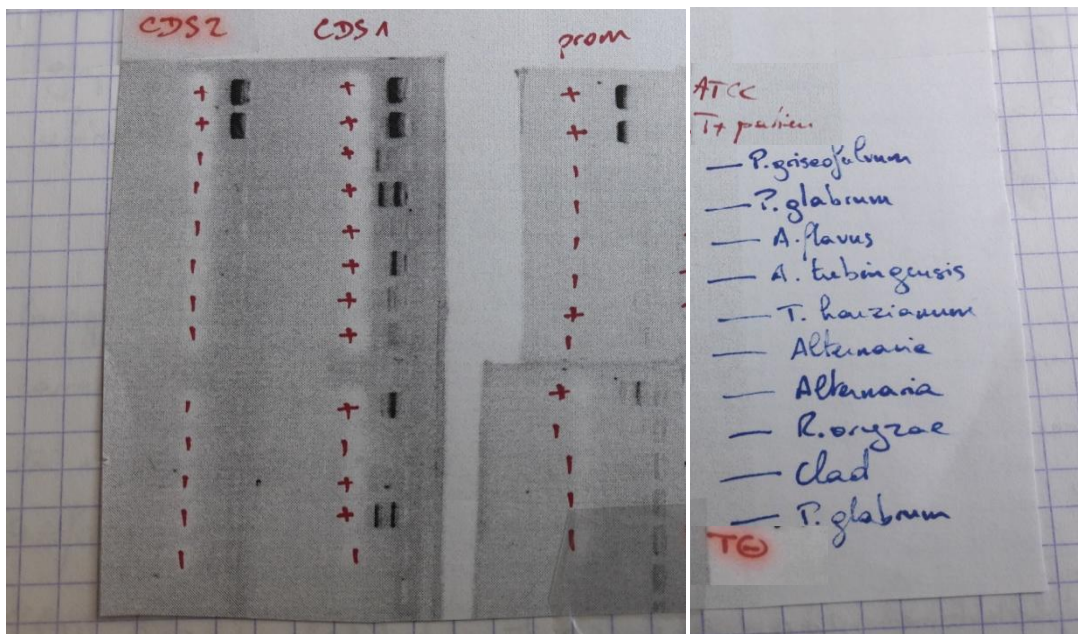


Figure 37 : Photo du gel de la PCR pour les trois régions (promoteur, CDS1 et CDS2)

### III.2. Analyse des séquences

La recherche d'homologie entre la séquence CDS de *cyp51A* (pour l'isolat T3 : *A. flavus*) et les séquences de GenBank n'a donné aucune séquence homologue à la notre du fait que notre séquence contient beaucoup d'imprécision nucléotidique. En effet notre séquence comporte beaucoup de résidus non identifiés par le séquenceur et sont donc codés N au lieu des codes A, C, G ou T. Ceci serait du aux amorces utilisées qui ne correspondaient pas à notre espèce et donc le gène aurait été mal cadré par ces amorces car non spécifiques. La même imprécision nucléotidique a été observée dans les résultats de séquençage des isolats T1, T2, T5 et T6 ; Seul l'isolat T4 a donné des résultats d'homologie meilleurs en utilisant une partie de cet allèle :  
ACGGAGTATTCCTAGCACACATTGTGGCACTGCACTGCCCATCCTACCACCACTC  
GGTACTAGTACGACTTGACTACTTTCTAGTATAACA.

Le résultat du BlastX de cette portion a donné le peptide : HIVALHCPSYHHSVLV ; le quel présente une homologie avec le peptide de Genbank : HLLSLHWNRQHHSFLI. L'homologie entre notre peptide et celui de Genbank est estimée par une E-value de 7,5 une similarité de 68,75%(soit 11/16) et un % d'identité de 44% (soit 7/16) :

Peptide	H	I	V	A	L	H	C	P	S	Y	H	H	S	V	L	V
		+	+	+			*	*	*	*				*		+
Genbank	H	L	L	S	L	H	W	V	R	Q	H	H	S	F	L	I

Le peptide proposé par GenBank codé B8N8S1 (HLLSLHWNRQHHSFLI) correspond à une RNA polymérase II transcription Factor et non pas à une 14 alpha-déméthylase. Le peptide (HIVALHCPSYHHSVLV) de la transcription de notre séquence n'a donné aucun résultat après blasting sur UniProtKB.

Le logiciel Clustal Omega a permis la confirmation que la séquence T4 alignée avec la séquence *cyp51A* GenBank codée (JF450924.1) n'est pas une déméthylase.

-Pour *A.tubingensis* les nucléotides identiques entre les deux séquences sont arrangés sur les lignes (5, 7, 16, 19, 20, 21,22) (Figure 38).

La matrice du pourcentage d'identité d'*A.tubingensis* est estimé par

1: Aspergillus 100.00 57.14

2: T4seq2 57.14 100.00

Aspergillus T4seq1	ATGGCATATCTTGCTGTTGCAGGCGCCTACGCTTTCGCAGCGTTGCTCGTTGCGATAGTC -----	60 0
Aspergillus T4seq1	TTGAATGTCGCGCGCCAATTGCTCGTTCGCAACGAGAAAGAACCCCGTTGTCTTCCAT -----	120 0
Aspergillus T4seq1	TGGATTCCCTTCTGGGAAGCACAATCAGCTATGGGATGGATCCCTATGCATTCTTCTTC -----	180 0
Aspergillus T4seq1	TCCTGCAGGAAAAAGGTCAGCCACTGTCCATATGCGATTGCCAATGAATACTAACCAAAG -----	240 0
Aspergillus T4seq1	CGGTTGAATAGTACGGAGACATCTTACCTTCGTGCTCCTGGGCAAAAAGACAACCGTAT -----ACGGA----- *****	300 5
Aspergillus T4seq1	ACTTGGGCGTTCAAGGCAACGATTTTCATCCTCAATGGCAAACCTCAAGGACGTGAGCGCGG -----	360 5
Aspergillus T4seq1	AAGAGGTCTACAGCCCTCTCACCACCCCGGTGTTCCGGTCCGACGTTGTGTACGACTGCC -----GTATTCCT----- ** ***	420 13
Aspergillus T4seq1	CTAACTCCAAGCTGATGGAACAAAAGAAATTCATCAAGTTTGGCCTCACGCAAGCGGCGC -----	480 13
Aspergillus T4seq1	TCGAGTCACACGTTTACGCTGATTGAAAAGGAGACCCCTCGACTATCTCCGGGACTCTCCAC -----	540 13
Aspergillus T4seq1	GGTTCAACGGCGGAGTGGAGTTATTGATATTCCTGCTGCCATGGCTGAGATTACAATCT -----	600 13
Aspergillus T4seq1	ATACTGCTGCACGCGCTTGCAGGGCGAGGAGTCCGCAAGAAGCTTACTGCGGAGTTCG -----	660 13
Aspergillus T4seq1	CTGAACTGTACCACGATCTCGACAAGGGGTTTCAGCCCCATCAACTTTATGCTCCCTTGGG -----	720 13
Aspergillus T4seq1	CTCCGTTGCCGACAAACCGGAAGCGTGATGCTGCTCATGCTCGGATGAGGGAGATTTACA -----	780 13
Aspergillus T4seq1	CAGACATCATCAATGAACGGCGCAAGAACCCAGACGAGGAGAAGTCCGACATGATCTGGA -----	840 13
Aspergillus T4seq1	ACCTGATGCACTGCACCTACAAGAACGGACAGCCGGTCCCGGACAAAGAGATTGCTCACA -----	900 13
Aspergillus T4seq1	TGATGATCACACTGTTGATGGCAGGGCAACACTCCTCTTCTCAATTAGCTCTTGATTA -----AGCACATGTGGCACTGC---ACTGC----- *** * ***** ** *** *	960 38
Aspergillus T4seq1	TGTTGCGACTAGCCTCTGAGCCTCAAGTGTGAAGAGCTCTATCAAGAACAGTTGACCA -----	1020 38
Aspergillus	GCCTCAGCAACAGGAACGGGGTCTTCGAGCCGCTGCAGTATCAGGACCTTGACAAGCTGC -----	1080

T4seq1	-----	38
Aspergillus T4seq1	CACTCCTCCAAAGTGTTCATCAAGGAGACTCTACGAATCCACTCGTCCATCCACTCGATCA -----CCATCCTACCACCACTCGGTAC * * * * * * * * * *	1140 60
Aspergillus T4seq1	TGCGCAAGGTGAAGAACCCGCTACCAGTACCTGGCACATCTTACGTTATCCCTGAAGACC TAGT-----ACGACTT----- * * * * *	1200 71
Aspergillus T4seq1	GTGTTCTACTCGCCTCACCAGGCGTAACAGCCCTTAGTGATGAATACTTCCCCAACGCAA -----GACTACTTTC----- * * * * * *	1260 81
Aspergillus T4seq1	CCCGGTGGGATCCACACCGTTGGGAGAACCAACCTGACAAGGAGGAAGAAGGAGAGATGG -----TAGTATACA----- * * * * *	1320 90
Aspergillus T4seq1	TCGACTACGGATATGGCAGCGTGTCCAAGGGCACTGCCAGTCCCTACCTGCCTTTTGGCG -----	1380 90
Aspergillus T4seq1	CTGGCCGCCACCGCTGCATGGAGAGAAGTTCGCCTACGTTAATCTGGGCGTCATTATCGC -----	1440 90
Aspergillus T4seq1	GACCATCGTGCCTCACCTGAAGCTATTTAATGTGGATGGCAGGAAAGGAGTGCCAGGAAC -----	1500 90
Aspergillus T4seq1	CGATTACTCGACGCTCTTCTCCGGTCCCTTGAAGCCTGCTATCGTGGGCTGGGAGCGACG -----	1560 90
Aspergillus T4seq1	CATCCAAGACAACCTCCAAGGGTCTTGAAGTAA	1594
	-----	90

**Figure 38** : Alignement des séquences par Clustal O (1.2.4) pour *A. tubingensis*

### III.3. Discussion

Notre étude effectuée dans la perspective de mettre en évidence d'une éventuelle mutation dans le gène *cyp51A*, par la comparaison de nos séquences CDS de *cyp51A* avec les séquences de Genbank, a été limitée par le fait que nous avons été incapables de traiter les séquences qui sont soit courtes ou présentent des défauts de séquençage lors de l'utilisation du programme BlastX. le séquençage du gène *cyp51A* a montré également des séquences courtes par rapport aux isolats de type sauvage dans les travaux de (Snelders, 2012) qui a prouvé que ces résultats peuvent être dus aux difficultés causées lors de l'analyse de *cyp51A* durant la phase de traduction puisque de nombreux isolats présentaient des zones d'insertion dans le gène par rapport à la séquence de référence. Ces insertions sont composées de zones répétées avec un même motif de deux ou trois nucléotides répétés un nombre de fois. Il est donc légitime de s'interroger sur la fonction de cette protéine dans la cellule et son rôle.

Le mécanisme de résistance aux azolés est connu pour le genre *Candida* et est en cours d'investigation depuis ces dernières années pour *Aspergillus fumigatus*. En revanche, aucune donnée n'est disponible pour les autres espèces telle que *P. griseofulvum*, *P. glabrum*, *A. flavus*, *A. niger*, *T. harzianum*, et *A. alternata*. L'étude des mutations sur le gène *cyp51A* chez les espèces décrites précédemment est rendue difficile par l'absence des données reconnues dans la littérature, surtout concernant les amorces spécifique pour chaque région de la protéine *cyp51* ceci est rapporté également dans les travaux de (Liu *et al*, 2011). Dans notre étude nous avons utilisé les amorces définies pour *fumigatus* parce qu'ils ont couramment utilisés dans les laboratoires de mycologie médicale notamment dans le laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale La Timone, Marseille (France), cependant ce dernier est intéressé par l'étude d'*A.fumigatus* comme espèce modèle des filamenteux. Les séquences courtes (partielles) obtenus dans notre travaille peu être due a ces amorces non spécifique des espèces cités précédemment, donc le gène a été mal cadré par ces amorces. On peu dire alors que le dessin des amorces pour les zones situées de part et d'autre du gène d'intérêt (*cyp51A*), est nécessaire pour réussir le séquençage. Ceci est décrite aussi dans les travaux de (Frandsen *et al*, 2012) qui a prend les séquences nucléotidiques de chacun des loci du gène *cyp51A* (chromosome 6), *B* (chromosome 1) et *C* (chromosome 5) de la base de données sur laquelle le génome du complexe d'espèces *Fusarium solani* est hébergé (<http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Necha2>) et les utilisées pour le dessin d'amorces afin d'étudier des mutations sur *cyp51* de cette espèce ,Cependant, aucune donnée n'est disponible à ce jour pour expliquer cet problématique. De ce fait, les résultats de cette première approche sur la mutation pourront être ultérieurement complétés et vérifiés par l'exploration de ce phénomène par des techniques plus complexes.

Selon Azhar Hussain, 2009, le blé dur est fréquemment exposé à de nombreux agents pathogènes transmis par la semence ce qui entraîne une perte qualitative et quantitative du rendement. Donc, la semence saine est considérée comme un facteur limitant pour réussir une année agricole. L'un des aspects les plus importants d'une bonne semence, est d'être dénué d'agents pathogènes.

Du point de vue diversité des souches isolées, il n'y avait pas de différence significative entre les deux échantillons de blé dur analysés (traité et non traité). Nos résultats ont montré que la mycoflore isolée était diversifiée avec 7 genres fongiques. La contamination des céréales par ces genres a été rapportée dans plusieurs études en Algérie (Moghtet, 2012) ainsi que dans d'autres pays méditerranéens tels que la Tunisie et le Maroc (Belkacem-Hanfi, 2013; Tahani, 2008, Riba, 2010) et également en Europe (Gregori, 2013; Magan, 2003; Medina, 2006; Tabuc, 2009) ainsi qu'en Afrique du Sud (Rabie, 1997). Les résultats de l'analyse mycologique ont montré, quelque soit l'année de la récolte, une nette dominance du genre *Aspergillus*. La dominance de ce genre dans la flore contaminée des céréales a, également, été reportée par plusieurs auteurs (Pitt et Christian, 1968 ; Pitt et Miscamble, 1995; Riba *et al.*, 2005 ; Tahani *et al.*, 2008; Houssou, 2009). Les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus dominantes dans nos échantillons de céréales. Ces genres étant considérés comme des moisissures de stockage car ils tolèrent la plus faible humidité (Christensen, 1977 ; Tahani, 2008 ; Gacem, 2011 ; Singh, 2011 ; Belkacem -Hanfi, 2013). *A. flavus* est l'espèce la plus fréquente suivie de *Penicillium*. Les autres genres de mucorales, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Botrytis* et *Cladosporium* isolés sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol, ce qui est en accord avec les études de Christensen (1977).

Il en ressort, également, à travers cette étude que la méthode de dilution a donné le plus grand nombre de champignons par rapport à la méthode du papier filtre. Cependant, d'autres auteurs ont rapporté que cette dernière permettait l'isolement de la majorité des champignons contrairement à la méthode de suspension-dilution (Singh ,1999; Janmajay Singh, 2011). Ce résultat contradictoire obtenu dans notre travail, pourrait s'expliquer par une éventuelle croissance lente causée par le papier filtre qui pourrait ne pas avoir favorisé le développement des espèces préférant les milieux riches en composants organiques présents dans le milieu PDA. Par ailleurs, certains champignons tels que *T. harzianum*, *R. oryzae*, *B. cinerea*, *A.alternata*, et *C. cladosporioides* n'ont été observés que lors de

l'utilisation de la méthode de dilution. C'est ce qui est également en corrélation avec les travaux de Gohari (2007) et Gacem (2011).

Concernant les fongicides testés, nos résultats nous ont permis de constater que le traitement réduisait le nombre de flores fongiques des semences, des feuilles et des épis de blé dur. En effet, les graines traitées par le Raxil® 060 FS et les feuilles et épis traités par l'Amistar®Xtra et l'Artea®330EC ont été moins sujettes aux contaminations en comparaison de celles non traitées. Cette efficacité des fongicides triazolés sur la mycoflore des semences, des feuilles et des épis a également été rapportée par Bharat rai, (1997) ; Ezzahiri, (2001) ; Zahri, (2008), Meksem-amara, (2007) et Hennouni, (2012). La présente étude est une preuve croissante que l'exposition environnementale aux fongicides triazolés entraîne l'apparition des mécanismes de résistances difficiles à éliminer parce que certaines espèces, telles que *A. flavus*, *A. niger*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum* et *T. harzianum* ont pu se développer sur les semences traitées, ce qui pourrait s'expliquer par la résistance de ces espèces aux triazolés. Cette résistance a été mentionnée, pour certaines espèces comme *Aspergillus* et *Penicillium* (Florent Morio, (2012) et Hiroshi Hamamoto, (2000).

Les 10 espèces identifiées par MALDI-TOF MS l'ont également été par PCR séquençage, à l'exception de la souche *A. tubingensis*. En effet, cette dernière a été identifiée, par PCR et par méthode conventionnelle, comme étant *A. niger* alors que la spectroscopie de masse a révélé que cette souche s'apparentait à l'espèce *A. tubingensis*. Ce résultat confirme bien que les *Aspergillus* noires sont difficiles, voire impossible, de les différencier les uns des autres en utilisant des techniques classiques, ce qui est en accord avec les études réalisées par Abarca (2004) et Alcazar-Fuoli (2009). En effet, la capacité de la technologie MALDI-TOF MS utilisée pour identifier un large éventail d'espèces de moisissures a fait l'objet de nombreux travaux ayant pour objectif de faciliter l'identification des espèces fongiques pathologiques (Seng, 2009 ; Cassagne, 2011 ; Gautier, 2016).

Les essais réalisés au cours des deux campagnes 2013-2014 et 2014-2015, avec les triazolés seuls ou combinés au Azoxystrobine, un dérivé de la famille des strobilurines, ont mis en évidence l'intérêt de ces fongicides pour lutter contre les pathogènes du blé dur 'GTA'. Un traitement des semences, plus deux applications au champ, au stade montaison et au stade floraison, ont permis d'obtenir une bonne protection avec une réduction considérable des pathogènes. Cette amélioration de l'état sanitaire va assurer une



augmentation du rendement du blé. Les triazoles testés (Raxil® 060 FS Artea® 330EC et Amistar®Xtra) ont entraîné une diminution importante du développement des filamenteux. Ceci confirme que les triazoles inhibent la biosynthèse des stérols, constituants essentiels des champignons, en bloquant la C14-  $\alpha$ -déméthylase. Ce résultat est en accord avec celui de Darmedru, (1994) et Zahri, (2008). Les matières actives, tébuconazole, Azoxystrobine + cyproconazole, cyproconazole + propiconazole contenu dans le Raxil® 060 FS, l'Amistar® Xtra et l'Artea® 330EC, ont été prouvées comme étant efficaces contre les mycètes pathogènes des céréales dans les travaux de nombreux auteurs (Sawinska et Małeczka, 2007 ; (Zahri, 2008 ; Hennouni, 2012).

Les trois fongicides étudiés agissent différemment sur la croissance *in vitro* des isolats résistants aux traitements. Les deux derniers, Artea® 330EC et Amistar® Xtra réduisent considérablement la croissance des isolats (quatre souches résistantes) par rapport au Raxil® 060 FS (six souches résistantes), cependant l'Artea® 330EC est plus efficace que l'Amistar® Xtra. En effet, les pourcentages d'inhibition dus à l'Artea® 330EC sont supérieurs à ceux de l'Amistar® Xtra (Tableaux 13 et 14). Cela révèle une hypersensibilité des champignons vis-à-vis de l'Artea® 330EC et une sensibilité relative à l'Amistar® Xtra. Donc les résultats les plus satisfaisants sont obtenus par l'association des triazolés ou triazolés au strobilurines, fongicide de famille différente avec un mode d'action différent. Les champignons sont alors affectés à différents sites biochimiques et différents stades de développement (Beck, 1995) et risquent moins de développer une résistance (Kosman, 1996). Nos résultats montrent que les combinaisons de triazolés sont plus efficaces que les associations entre fongicides de familles différentes. Cependant, d'autres auteurs ont prouvés l'inverse (Gisi, 1996 ; Zahri, 2008). Ce résultat contradictoire obtenu dans notre travail permet de confirmer l'efficacité des azolés contre les pathogènes des céréales par rapport aux autres fongicides, ce qui a été prouvé par Meksem-amara (2007) et Hennouni, (2012). Les niveaux de résistance ou de sensibilité des isolats varient pour chaque fongicide en fonction des concentrations. Les résultats relatifs aux différents diamètres des colonies montrent une baisse significative observée suite aux traitements avec les trois produits fongiques par rapport aux témoins. Cependant, à faibles doses (D1, D2) les trois fongicides utilisés affectent faiblement ce paramètre. Ce qui est en corrélation avec les travaux de Hennouni (2012). Le test de comparaison des moyennes pour les différentes doses appliquées confirme que l'application de la dose la plus élevée de fongicide (D6) constitue un groupe à part par rapport aux autres groupes puisque c'est celle qui a affiché le plus fort impact sur le taux de développement. Le témoin constitue

également un groupe différent. Au niveau de chaque fongicide, les barres portant la même lettre (a, b, c, d, e, f ou g) appartenant au même groupe donc ils ne sont pas significativement différentes ( $\alpha=0,05$ ). Ce résultat est en accord avec les travaux de (Koffi, 2009). Par ailleurs ces trois fongicides sont classés parmi les fongicides utilisés pour le traitement des champignons du blé. Bien que ces fongicides aient réduit la croissance des champignons, cependant, à faible doses (D1, D2, D3, D4) aucun des trois fongicides n'a permis d'avoir 100% d'inhibition. Cela pourrait expliquer le développement avec le temps de souches résistantes à ces fongicides. La différence au niveau de la sensibilité des pathogène aux fongicides testés peut être attribuée au fait que le produit chimique Raxil® 060 FS est beaucoup plus utilisé par les agriculteurs en tant que « traiteur de semences ». En effet, suite à un usage prolongé, la sensibilité des champignons vis-à-vis du produit aurait diminué et une résistance potentielle pourrait ainsi se développer.

Selon les travaux de (Snelders, 2012), Le séquençage du gène *cyp51A* a montré des séquences courtes par rapport aux isolats de type sauvage. Ceci est également trouvé dans notre étude. Snelders a prouvé que ces résultats peuvent être dus aux difficultés causées lors de l'analyse de *cyp51A* durant la phase de traduction puisque de nombreux isolats présentaient des zones d'insertion dans le gène par rapport à la séquence de référence. Ces insertions sont composées de zones répétées avec un même motif de deux ou trois nucléotides répétés un nombre de fois.

Il est donc légitime de s'interroger sur la fonction de cette protéine dans la cellule et son rôle. De ce fait, les résultats de cette première approche sur la mutation pourront être ultérieurement complétés et vérifiés par l'exploration de ce phénomène par des techniques plus complexes.

Le mécanisme de résistance aux azolés est connu pour le genre *Candida* et est en cours d'investigation depuis ces dernières années pour *Aspergillus fumigatus*. En revanche, aucune donnée n'est disponible pour les autres espèces telle que *P. griseofulvum*, *P. glabrum*, *A. flavus*, *A. niger*, *T. harzianum*, et *A. alternata*. L'étude des mutations sur le gène *cyp51A* chez les espèces décrites précédemment est rendue difficile par l'absence des données reconnues dans la littérature, surtout concernant les amorces spécifiques pour chaque région de la protéine *cyp51*. Ce fait a également été rapporté dans les travaux de (Liu *et al*, 2011).

Dans notre étude nous avons utilisé les amorces définies pour *fumigatus* parce qu'ils ont couramment utilisés dans les laboratoires de mycologie médicale notamment dans le laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale La Timone, Marseille (France), cependant, ce dernier n'est intéressé que par l'étude de *fumigatus* comme espèce modèle des filamenteux. Les séquences partielles obtenus dans notre travaille peuvent être dues a ces amorces donc le gène aurait été mal cadré par ces amorces car non spécifiques. Donc on peu dire que le dessin des amorces pour le gène d'intérêt (*cyp51A*) est nécessaire pour réussir le séquençage. Ceci est décrit dans les travaux de (Frandsen *et al*, 2012) qui a pris les séquences nucléotidiques de chacun des loci *cyp51A* (chromosome 6), *B* (chromosome 1) et *C* (chromosome 5) de la base de données sur laquelle le génome du complexe d'espèces *Fusarium solani* est hébergé (<http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Necha2>) et les a utilisées pour le dessin d'amorces afin d'étudier des mutations sur *cyp51* de cette espèce.

En plein champ, l'agriculteur a utilisé 0.5 L/300 L d'eau de chaque fongicide décrite précédemment pour traiter un hectare de la culture de blé dur. *In vitro* 0.5 L/300 L d'eau correspond à 190µl/114 ml d'eau dans une boîte de Pétri. Il est à noter qu'à cette dose il ya une diminution de développement des pathogènes par rapport aux témoins mais elle n'est pas importante. C'est la raison pour laquelle nous avons appliqué des doses supérieures (200µl, .230µl, 250µl et 270µl). Cette dernière correspond à la dose inhibitrice avec 100% de mortalité. Comparativement aux travaux de Hennouni, (2012) qui à révélé que la dose de 0,5 L/ha est la plus efficace suivie de la dose 0,4 L/ha, mais avec une inhibition partielle. Notre expérimentation, montre que la dose la plus efficace à appliquer est celle de 0.71 L/h (270µl *in vitro*), en l'occurrence, 0.71 L/300L d'eau/h au lieu de 0.5 L/300 L d'eau/h pour inhiber totalement le développement des moisissures phytopathogènes affectant la culture de blé dur(GTA) afin d'améliorer le rendement.

La modernisation de l'agriculture est assurée grâce aux produits phytosanitaires. Toutefois, leur utilisation intensive n'est pas sans risque pour l'environnement et le consommateur. Les avancées apportées par ce travail peuvent être regroupées en trois volets :

- Une première étape de ce travail a donc consisté à mettre en évidence la présence des espèces phytopathogènes dans les semences, feuilles et épi de blé dur.

- La deuxième étape a pour but de mettre en évidence l'efficacité des trois produits fongicides systémiques nouvellement introduits en Algérie : le Raxil® 060 FS l'Artea®330EC et l'Amistar® Xtra sur la mycoflore des semences, feuilles et d'épis affectant le rendement et la qualité technologique du blé dur.

L'étude nous a permis d'aboutir à un ensemble de résultats, qui mettent en exergue l'action pathogène des champignons sur les 02 cultivars de blé utilisées dans notre expérimentation et l'influence des fongicides décrites précédemment sur les isolats. L'efficacité des fongicides a été démontrées notamment avec la plus forte dose (0,71L/ha). L'utilisation des fongicides a pour but de lutter contre une cible bien précise : le champignon pathogène. Le fongicide ne doit pas être toxique pour la culture ou son environnement. L'association des deux fongicides en même temps semble très nécessaire pour une meilleure efficacité afin de limiter l'attaque des pathogènes. Ceci a bel et bien été démontré durant cette étude. Les deux applications, l'une au stade fin-tallage début montaison, l'autre au stade floraison, ont permis d'obtenir une certaine protection. Cette amélioration de l'état sanitaire s'est traduite par une diminution du développement des pathogènes. En se basant sur les résultats obtenus, nous estimons que le Raxil® 060 FS l'Artea®330EC et l'Amistar® Xtra pourraient être des molécules à choisir dans le cadre d'un programme de lutte anticryptogamique raisonnée contre les moisissures. Néanmoins, sachant que toute molécule fongique utilisée à long terme, finit par aboutir à des phénomènes de résistance, il serait judicieux d'utiliser ces fongicides en alternance avec d'autres molécules non polluantes.

- Enfin, le dernier volet du projet a consisté à détecter des mutations dans le gène *cyp51A*. Malheureusement, l'analyse bioinformatique des séquences obtenues ne nous a pas permis d'obtenir des résultats exploitables et ce, probablement à cause de l'utilisation, par le laboratoire (Hôpital la Timone, France) d'amorces non spécifiques des espèces étudiées. Ce point pourrait être, ultérieurement, repris, complété et vérifié.

Pour conclure ce travail, nous pouvons retenir que :

✓ Les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Alternaria* semblent être moins sensibles que les autres genres aux fongicides testés.

✓ La présente étude est une preuve croissante que l'exposition environnementale aux fongicides triazoles entraîne l'apparition des mécanismes de résistances difficiles à éliminer. Les résultats obtenus lors de ce travail sont très intéressants et mériteraient d'être complétés par des recherches approfondies dans le domaine de la résistance aux triazolés en agriculture. Ce qui permettrait, également et éventuellement, de répondre à quelques interrogations dans le domaine médical concernant la résistance des souches fongiques au traitement à base de triazolés ou encore expliquer le phénomène de récurrence des patients à certaines pathologies mycologiques.

Comme éventuelles perspectives, nous pouvons dire qu'au terme de cette étude, plusieurs points importants restent à préciser. Il serait en effet important de :

- réaliser des études approfondies sur le gène *cyp51* afin de mettre en évidence et de confirmer d'éventuelles mutations pouvant résulter du traitement par les trois fongicides testés. Une telle étude devrait aussi être réalisée sur les doses des différents fongicides utilisés en agriculture pour éviter celles qui sont toxiques pour la culture, par l'évaluation *in vitro* des CMF de chacun par des méthodes rapides et développées telle que la technique par E-TEST qui reste de nos jours confinée au domaine médical.
- Enfin, il serait intéressant de faire une recherche sur d'autres végétaux beaucoup plus sensibles que le blé tel que les légumes et les fruits surtout ceux qui sont consommés sans cuisson afin de diminuer le risque de développement des résistances acquises d'origine environnementale pouvant être la source des maladies difficiles à guérir.

En résumé, nous pouvons dire que l'intérêt de notre étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de stratégies de prévention contre les infections fongiques afin d'assurer une sécurité sanitaire des aliments, une augmentation du rendement ainsi que la protection des récoltes et par conséquent l'économie du pays.

- 1- Abarca, M.L., Accensi, F. et Cano, J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergillus. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 86 : 33-49.
- 2- AFNOR. 1986. Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2emeEd, Lavoisier TEC & DOC, Paris. 250 - 263.
- 3- Akinsanmi, O.A., Mitter,V., Simpfendorfer,S., Backhouse, D. et Chakraborty, S. 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* sp isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research*. 55: 97-107.
- 4- Alcazar-Fuoli, L. Mellado, E. Alastruey-Izquierdo, A. Cuenca-Estrella, M. et Rodriguez-Tudela, J.L. 2008. Aspergillus section Fumigatus: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 1244–1251.
- 5- Alcazar-Fuoli, L. Mellado, E. et Alastruey-Izquierdo, A. 2009. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to Aspergillus section Nigri. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 4514 – 4517.
- 6- Altschul, S.F. Madden, T.L. Schaffer, A.A. Zhang, J. Zhang, Z. Miller, W. et Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25: 3389 - 3402.
- 7- Ammar, M. 2014.Organisation de la chaine logistique dans la filière céréales en Algérie. État des lieux et perspectives. p11
- 8- Amrani, B. 2013. Maladies : Méthode et échelle de notation des maladies et accidents divers. *Bulletin des grandes cultures*. 2: 5 - 7.
- 9- Annicchiarico, P. Bellah, F. Chiari, T. 2006. Repeatable genotype x location interaction and its exploitation by conventional and GIS-based cultivar recommendation for durum wheat in Algeria. *Eur. J. Agron*. 24: 70 - 81.
- 10- Anonyme, 2000. Note réglementaire. RE0.2000-06.
- 11- Anonyme, 2003. Le blé dur : qualité, importance et utilisation dans la région des hauts plateaux (Tiaret et Tissemsilt). ITGC. p7

- 12-Aouali, S. et Douici-Khalfi, A. 2009. Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie : symptômes, développement et moyens de lutte. ITGC, EL Harrach, Alger. p56.
- 13-Aouali, S. et Douici-Khalfi, A. 2013: Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie : symptômes, développement et moyens de lutte. ITGC. p8-36.
- 14 - Arvalis - Institut du végétal, 2018. <http://www.fiches.arvalis-infos.fr>
- 15- BASF France Agro, 2015. [www.agro.basf.fr](http://www.agro.basf.fr)
- 16- Barnett, H.L. et Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd eds. Burgess Publishing Company, Minneapolis. p331.
- 17- Bauer, J. & Gareis, M. 1987. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Journal of Veterinary Medicine*. 34: 613.
- 18- bayer-agri, 2018.[www.bayer-agri.fr](http://www.bayer-agri.fr)
- 19- Becher, R. Weihmann, F. Deising, H.B. Wirsal, S.G. 2011. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics*.12: 52.
- 20- Beck, J.J. Ligon, J.M. 1995. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology*. 85: 319-324.
- 21- Bégos, P. 2005. Reconnaître les maladies des céréales, dossier fongicide, paysan Breton. p1.
- 22- Belahcene, N. Bouasla, S. Debabsa, R. Djouamaa, M. 2008. Comportement morphologique, physiologique et biochimique de trois variétés de blé dur (*Triticum durum* .desf) sous traitement par un fongicide (TILT 250EC).D.E.S. Université de Souk Ahras. p13.

- 23- Belkacem-Hanfi, N. Semmar, N. Perraud-Gaime, I. Guesmi, A. Cherni, M. Cherif, I. Boudabous, A.E. et Roussos, S. 2013. Spatio-temporal analysis of postharvest moulds genera distribution on stored durum wheat cultivated in Tunisia. *J. Stored. Prod. Res.* 55 : 116 -123.
- 24- benbelkacem, A. 2007 : les triticales: cultures, performances et différentes possibilités d'utilisation en Algérie. Journée techniques sur la culture du triticales en zone semi aride et son utilisation par les animaux domestique : Oum Elbouagui Elkhroub. p17-18.
- 25- Bensadoun, A. 2010. Application de méthodes bayésiennes pour l'évaluation de l'incertitude d'un modèle de prévision de la septoriose sur blé : SEPTO-LIS. Mémoire d'ingénieur agronome : ENSA, El Harrach Alger. p49.
- 26- Benslimane, H. Lamari, L. Benbelkacem, A. Sayoud, R. et Bouznad, Z. 2011. Distribution of races of *Pyrenophora tritici-repentis* in Algeria and identification of a new virulence type. *Phytopathol. Mediter.* 1-9.
- 27- Bermond, A. 2002. Larousse agricole, Edi Mathilde Majorel. Editeur: Larousse (Paris). p767.
- 28- Bharat, R. Jariwala, S. et Manjari, K. 1997. Efficacy of fungicides and antibiotics on seed mycoflora and seed germination of some spices. *Indian Phytopath.* 50: 261-265.
- 29-Blé hybride HYNO- (onglet "le blé en général")  
[http://www.unctad.info/en/Infocomm/Agricultural\\_Products/Wheat/Culture/](http://www.unctad.info/en/Infocomm/Agricultural_Products/Wheat/Culture/).
- 30- Bonnefoy, X. 2007. Inadequate housing and health: an overview. *Int. J. Environment and Pollution.* 30: 3-4.
- 31- Borman, A. M. Palmer, M. D. Delhaes, L. Carrère, J. Favennec, L. Ranque, S. 2010. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med. Mycol.* 48: 88- 97.



- 32- Botton, B. Breton, A. Fevre, M. Gauthier, S. Guy, P. Larpent, J.P. Reymand, P. Sanglier, J.J. Vanssier, Y. et Veau, P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, 2e ed. Masson, Paris. 491- 498.
- 33- Boufenar- Zaghouane, F. et Zaghouane, O. 2006. Guide des principales variétés de céréales à paille en Algérie (blé dur, blé tendre, orge et avoine). ITGC, ICARDA. Alger. p154.
- 34-Bouhache, M. 2004. Index phytosanitaire du maroc. Edition 2004 - Ed. AMPP. p257.
- 35- Boulal, H. Zaghouane, O. EL Mourid, M. et Rezgui, S. 2007. Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, p176.
- 36- Boulif, M. 2011. Gestion intégrée des maladies du blé. Documentation d'appui. ENA de Meknès. p12.
- 37 - Bourgeois, C.M. Mescle, J.F. et Zucca, J.1996. Microbiologie Alimentaire. Tome1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Technique & doc Lavoisier, Paris. p672.
- 38- Boutigny, A.L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*. Bordeaux: Université Bordeaux 1. p 438.
- 39- Bouzerzour, H. 1998. La sélection pour le rendement en grain, la précocité la biomasse aérienne et l'indice de récolte chez l'orge (*Hordeum vulgare*.L) en zone semis-aride Thèse d'état université Mentouri Constantine : p165.
- 40- Boysen, M.E. Jacobsson, K.G. Schnürer, J. 2000. Molecular Identification of Species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1523-1526.
- 41- Brodeur, J. 2007. Principe et application de la lutte biologique. Colloque sur la lutte biologique et intégrée en foresterie 19-21mars, Cannada. Quebec.

- 42- Burney, P.H. 2011. Production et commerce mondial en céréales en 2010-2011. Livre blanc <céréales> ULg Gembloux Agro.bio.tech.et CRA-W Gembloux. p1-10.
- 43- Cadi, A. 2005. Caractérisation des zones céréalières potentielles à travers le Nord de l'Algérie. *Rév. ITGC. Céréaliculture* 44 : 36 - 39.
- 44- Cahagnier, B. Richard-Molard, D. 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés. Ed. Tec & Doc. p140-158.
- 45- Calvet, R. Barriuso, E. Bedos, C. Benoit, P. Charnay, M.P. Coquet, Y. 2005. Les pesticides dans le sol : conséquence agronomique et environnementale. Edition France Agricole. p637.
- 46- Carter, A. 1987. Document de travail : Propiconazole. Site Internet: [www.hcsc.gc.ca](http://www.hcsc.gc.ca).
- 47- Cassagne, C. Ranque, S. Normand, A.C. Fourquet, P. Thiebault, S. Planard, C. Hendrick, M. et Piarroux, R. 2011. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE*. 6: 1-9.
- 48- Chabasse, D. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale. p25-27.
- 49- Chamant, S. 2013. *Blumeria graminis* Biologie, épidémiologie. INRA [En ligne] : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/16203/hypp-Biologie-epidemiologie>.
- 50- Champion, R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Edition INRA, Paris. p401.
- 51- Chehat, F. 2007. Analyse macroéconomique des filières, la filière blés en Algérie. Projet PAMLIM « Perspectives agricoles et agroalimentaires Maghrébines Libéralisation et Mondialisation » Alger. p7-9
- 52- Choueiri, 2003. Analyse de filière. La céréaliculture [Online]. <http://www.agriculture.gov.lb>.

- 53- Christensen, C.M., Mirocha, C.J. et Meronuck, R.A. 1977. Molds, Mycotoxins and Mycotoxicoses. Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul, MN. **In**: Withlow, L.W. et Hagler, W.M., (2001), Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Quebec.
- 54- CIC, Conseil International des Céréales. 2000. **In** : Le blé dur en Afrique du Nord. Le bulletin Bidimensionnel .Agriculture et Agroalimentaire Canada. Vol13, N°11.
- 55- Clément, J. M. 1981. Larousse agricole **in** Bouasla, S. Debabsa, R. Djouamaa, M. 2008. Comportement morphologique, physiologique et biochimique de trois variétés de blé dur (*Triticum durum.desf*) sous traitement par un fongicide (TILT250EC).D.E.S Université de Souk Ahras.
- 56- Collot, M. 2008. Bulletin d'information phytosanitaire. DRDAF - service régional de la protection des végétaux.
- 57- Colnenne, C. Masse, J. et Crosson, P. 1988. Rythme d'apparition des racines primaires du blé. *Pers.Agro*.128: 16- 20.
- 58- Couvreur, 2002. Fongicides des céréales et des protéagineuse. Edition ITCF. p216.
- 59- Croxatto, A. Prod'hom, G. Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 36: 380 - 407.
- 60- Cuenca-Estrella, M. 2014. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clinical Microbiology Infection*. 20: 54 - 9.
- 61- Dannaoui, E. Desnos-Ollivier, M. Garcia- Hermoso, D. Grenouillet, F. Cassaing, S. Baixench, M.T. 2012. *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010.*Emerging Infectious Diseases*. 18: 86 - 90.
- 62- Darmedru, J.Y. Duvert, P. Lacombe, J.P. Pepin, R. BUT - Fongicide des orges d'hiver et de printemps.1994. *Phytoma Déf. Vég*. 465: 52-53.
- 63- De Aguirre, L. Hurst, S.F. Choi, J.S. Shin, J.H. Hinrikson, H.P. Morrison, C.J. 2004.

Rapid Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3495-3504.

64- Denning, D.W. Parc, S. Lass-Flörl, C. Fraczek, M.G. Kirwan, M. Gore, R. 2011. High-frequency triazole resistance found in non culturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis.* 52: 1123-1129.

65- Devale, R. Bastard, L. et Nussbaumer, A. 2000. Le blé a lui aussi son helminthosporiose. *Phytoma.* 526: 17-20.

66- Dial, S.M. 2007, fungal diagnostics: current techniques and future trends, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 37: 373-92.

67- Djermoun, A. 2009. La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Nature & Technologie.* 1: 45 -53.

68- Doumandji, A. Doumandji-mitiche, B. Salaheddine, D. 2003. Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage office des publications Universitaires. p1-22.

69- Doyle, M.P. Beuchat, L.R. et Montville, T.J. 1998. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. ASM press. Washington D.C.

70- Duron, B.S. 1999. Le transport maritime des céréales. Mémoire de D.E.S. université d'aix-marseille. p81.

71- El hadj Hammiche, F. 2013. Problématique. 1er Workshop international sur La fusariose des céréales en Algérie. INPV Institut National de la Protection des végétaux SYNGENTA.

72- Ezzahiri, B. 2001. Les maladies du blé Identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. Transfert de technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA 77. p1- 4.

73- Ezzahiri, 2010. Maladies fongiques foliaires du blé Quelle menace pour la campagne en cours? *Agriculture du Maghreb.*41: 66-74.

- 74- FAO. 2013. Stockage et conservation des grains à la ferme. [www.fao.com](http://www.fao.com).
- 75- Feliachi, K. 2000. Programme de développement de la céréaliculture en Algérie. In proc. symposium blé 2000, enjeux et stratégie Algérie. p 21-27.
- 76- Feillet, P. 2000. Le grain de blé composition et utilisation INRA, paris. p17-18.
- 77- Feuilhade de Chauvin, M. 2005. New diagnostic techniques. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 19: 20-24.
- 78- Filtenborg, O. Frisvad, J.C., Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 85-102.
- 79- Frandsen, R.J, Frandsen, M. Giese, H. 2012. Targeted gene replacement in fungal pathogens via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Methods Mol Biol.* 835: 17-45.
- 80- Gacem, M.A. Oueld elhadj khelil, A. et Gacemi, B.A. 2011. Etude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Algerian journal of arid environment.* 1: 67-76.
- 81- Gate, P. 1995. Ecophysiologie du blé. Ed. Lavoisier, Paris. p429.
- 82-Gautier, M. Normand, A.C. L'Ollivier, C. Cassagne, C. Reynaud-Gaubert, M. Dubus, J.C. Brégeon, F. Hendrick, M. Gomez, C. Ranque, S. et Piarroux, R. 2016. *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. *Med. Mycol.* 54: 459- 470.
- 83- Giban, M. 2001. Diagnostic des accidents du blé tendre. Ed. ITCF, France. p159.
- 84- Girard, M.C. Walter, C. Rémy J.C. Berthelin J. et Morel, J.L. 2005. Sols et Environnement, Eds., Dunod, Paris. p816.
- 85- Gisi, U. 1996. Synergistic interaction of fungicides in mixtures. *Phytopathology.* 86: 1273-1279.

- 86- Godon, B. et Loisel, W. 1997. Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. Paris, Lavoisier, Technique et documentation. p820.
- 87- Gohari, A.M. Sedaghat, N. Javan-nikkhah, M. et Sabeririseh, R. 2007. Mycoflora of Wheat Grains in the Main Production Area in Kerman Province, Iran. *Int. J. Agri. Biol.* 9: 335-336.
- 88- Görtz, A. Oerke, E.C. Puhl, T. Steiner, U. 2008. Effect of environmental conditions on plant growth regulator activity of fungicidal seed treatment of barley. *Journal of Applied Botany and food quality.* 82: 60-68.
- 89- Graybill, J.R. Burgess, D.S. Hardin, T.C. 1997. Key issues concerning fungistatic versus fungicidal drugs, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 16: 42-50.
- 90- Gregori, R. Meriggi, P. Pietri, A. Formenti, S. Baccarini, G. and Battilani, P. 2013. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. *Food Control.* 30: 280-287.
- 91- Grignac, P.H. 1965. Contribution à l'étude de *Triticum durum* Desf. Thèse de Doctorat Université de Toulouse. p240.
- 92- Guegan, H. Chevrier, S. Belleguic, C. Deneuville, E. Robert-Gangneux, F et Gangneux, J.P. 2018. Performance of Molecular Approaches for Aspergillus Detection and Azole Resistance Surveillance in Cystic Fibrosis. *Frontiers in Microbiology.* 9: 1-6.
- 93- Guignard, J.L. Dupont, F. 2004. Botanique systématique moléculaire.13 Ed révisé Masson Paris. p116-117.
- 94- Guillot, J. et Dannaoui, E. 2015. Résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire Bull. Acad. Vét. France - Tome 168 - N°4.
- 95- Guiraud, J.P. 2003. Microbiologie alimentaires. (edn) Dunod. Paris. p651.
- 96- Hadria, R. 2006. Adaptation et Spatialisation des modèles stricts et la gestion d'un périmètre céréalier irriguée en milieu semi aride. Thèse de doctorat. Uni Cadi ayyad Samlalia-Marrakech.

- 97- Hargas, H. 2007. Identification et sélection de caractères de résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) dans les conditions semi-arides des Hauts Plateaux de Sétif. Mém. Magister, Inst. Nat. Agro., El- Harrach, Alger. p73.
- 98- Hageskal, G. Knutsen, A.K. Gaustad, P. de Hoog, G.S. Skaar1, I. 2006, Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7586-7593.
- 99- Hamadache, A. 2001. Les ressources fourragères actuelles en Algérie. Situation et possibilité d'amélioration. In Actes de l'atelier national sur la stratégie du développement des cultures fourragères en Algérie. Edition ITGC. p79.
- 100- Harrat, W. 2009. Effet in vivo et in vitro des éléments fertilisation N et K sur la résistance de blé à la septoriose et à la tache bronzée (tan spot). Mémoire de magister. ENSA.El Harrach -Alger. p110.
- 101- Hayma, J. 2004. Le stockage des produits agricoles tropicaux, *Fondation Agromisa* Wageningen : 80
- 102- Hinrikson, H.P. Hurst, S.F. De Aguirre, L. Morrison, C.J. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. 43: 129-137.
- 103- Hiroshi, H. Koji, H. Royj, N. Young, J.L. Yoshiyuki, M. Katsumi, A. et Tadaaki, H. 2000. Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14a Demethylase Gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Appl.Environ.Microbiol.* 66: 3421-3425.
- 104- Hennouni, N. Djebar, M.R. et Djebar-Berrebbah, H. 2012. Effect of systemic fungicide (combination of Cyproconazole and propiconazole) newly introduced in Algeria on *Septoria* of two varieties of wheat (*Triticum durum* Desf). *Advances in Environmental Biology.* 6: 1433-1441.
- 105- Hennouni, N. 2012. Evaluation du métabolisme respiratoire et enzymatique des racines de blé dur (*Triticum durum*) issues de plantes infectées par les maladies cryptogamiques et de plantes traitées avec un fongicide (ARTEA EC 330). Thèse de doctorat en Toxicologie Cellulaire. Université Badji Mokhtar Annaba. p107.

- 106- Houssou, P.A. 2009. Natural infection of cowpea by toxigenic fungi and mycotoxin contamination in Benin, West Africa. *J. Stored Prod.* 45: 40-44.
- 107- Huber, L. Madden, L.V. et Fitt, B.D.L. 2006. Environmental biophysics applied to the dispersal of fungal spores by rain-splash. In Cooke, B.M., Jones, D.G. & Kaye, B. éditeurs: *The Epidemiology of Plant Diseases*, 417–444. Kluwer Academic Publishers.
- 108- Hubert, P. 1998. Recueil de fiches techniques d'Agriculture Spéciale. 17: 23-27.
- 109- Hulvey, K.B. Leger, E.A. Porensky, L.M. Roche, L.M. Veblen, K.E. Fund, A. Shaw, J. Gornish, E.S. 2017. Restoration Islands: A tool for efficiently restoring dryland ecosystems?. *Restoration Ecology*. 25: 124-134.
- 110- INERIS, 2012. (Normes de qualité environnementale) azoxystrobine – N° CAS 131860-33-8. p1.
- 111- Jebbouj et Brahim-elyousfi, 2006. Contribution des trois feuilles supérieures de l'orge défoliées durant tout le cycle de croissance au rendement et comparaison entre la défoliation et les inoculations successives par *Pyrenophora teres.al awamia*. 3 :117.
- 112- Jin, J. Lee, Y.K. Wickes, B.L. 2004. Notes Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4293-4296.
- 113- Jouany, J. P. & Yiannikouris, A. 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *inra productions animales*. 15: 3-16.
- 114- Jouve, P. et Daoudi, A. 2001. Effet de la date de semis sur l'élaboration du rendement du blé tendre et de l'orge en zone semis aride et aride cas du Maroc. *Agri.Tropic*. 39: 193-200.
- 115- Koffi, C.N.B. Diallo, H.A. Kouadio, J.Y. 2009. Evaluation *in vitro* de la sensibilité de *Pythium aphanidermatum* aux fongicides utilisés dans les plantations de papayers en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3: 1114-1123.
- 116- Kosman, E. Cohen, Y. 1996. Procedures for calculating and differentiating synergism and antagonism in action of fungicides mixtures. *Phytopathology*. 86: 1263-1272.



- 117- Kumar, S.A. Reddy, E.P.N. Reddy, H.K. Devi, C.M. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloesporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri export zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathol. Bull.* 16: 157-160.
- 118- Larpent, J.P. 1990. Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2emeEd,Masson, Paris. p512.
- 119- Legrève, A. 2012. Pourquoi *Mycosphaerella graminicola* développe t'il si facilement des résistances au fongicides ? Petite histoire d'un grand stratège ! Université Catholique de Louvain. p4.
- 120- Lennox, G. 2003. L'importance du blé dans le monde. sur le site : ([http://pst.chezalice. fr/svtiufm/ble.htm](http://pst.chezalice.fr/svtiufm/ble.htm)).
- 121- Leroux, P.B. 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *C. R Biol.* 326: 9-21.
- 122- Lesage, V. 2011. Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen du grain de blé par l'étude de lignée quasi-isogénique. Thèse de doctorat. p17.
- 123- Liu, X.Yu.F. Schnabel, G. Wu, J. Wang, Z. Ma, Z. 2011. Paralogous cyp51 genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Biology.* 48: 113-23.
- 124- Magan, N. Hope, R. Cairns, V. et Aldred, D. 2003. Postharvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 723-730.
- 125- Magan, n. et lacey, j. 1988. Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology Elsevier.* 7: 245- 256.
- 126- Majumder, D. Rajesh, D. Suting, E.G. Debbarma, A. 2013. Detection of seed borne pathogens in Wheat. *Recent trends Australian Journal of crop Science.* 4: 500-507.
- 127- Manavathu, E.K. Ramesh, M.S. Baskaran, I. Ganesan, L.T. Chandrasekar, P.H. 2004. Acomparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B,

triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 386-389.

128- Masson, E. 2012. Diagnostic des accidents du blé tendre. *ARVALIS-Institut du végétal*. p36-40.

129- Maertens, P. et Clauzel, V.1989. Résultats obtenus par endoscopie. *Pers. agric.* 128: 55-57.

130- Medina, A. Valle-algarra, F.M. Mateo, R. Gimeno del Intado, J.V. Mateo, F. et Jimenez, M. 2006. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 196-203.

131- Meksem, L. R. Rouabhi, H. Djebbar- Berrebah, H et Djebbar, M.R. 2007. The impact of propiconazole (Tilt 250EC) on the growth and the breeding of hard wheat isolated roots (*Triticum durum*, GTA dur and Vitron varieties). *African Journal of Agricultural Research*. 2: 370-373.

132- Meyer, A. Deiana, J. & Bernard, A. (2004) *Cour de microbiologie générale*. Doin. France.

133- Mills, J.T. 1990. Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 982-986.

134- Mills, J.T. Sinha, R.N. et Wallace, H.A.H. 1978. Multivariate evaluation and isolation techniques for fungi associated with stored rapeseed. *Phytopathol.* 68: 1580-1525.

135- Moghtet, S. Kadi, H. Nahal, B. Nora-moussaoui, A. Amrouche, A. et Lazouni, A.H. 2012. Physicochemical factors' effect on fungal and mycotoxical contamination of French soft wheat marketed in Algeria. *Sciences du Vivant, Biologie*. 4: 2111- 4706.

136- Molinié, A. Faucet, V. Castegnaro, M. et Pfohl-leszkowicz, A. 2005. Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry*. 92: 391-400.

137-Morio, F. Guillaume, G.A. Danner-boucher, I. Haloum, A. Sacchetto, E. Garcia Hermoso, D. Bretagne, S. Miegerville, M. et Le pape, P. 2012. High prevalence of triazol resistance in *Aspergillus fumigatus* especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 157-164.

138-Mosiniak, M. Prat,R. et Roland, J.C. 2001 : du blé au pain. Copyright «biologie et multimédia source internet.

139- Multon, J.L. 1982. Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Derivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. p576.

140- Nagy, E. Moldovan, V. 2007. The effect of fungicide treatment on wheat common Bunt (*Tilletia* spp) in Transylvania. *Romania Agriculture Research.* 24: 34-37.

141- Nasraoui, B. 2006. Les Champignons Parasites Des Plantes Cultivées, Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Chapitre 4: Maladies. 363-427. Centre de Publication Universitaire, Tunis.

142- Nicoullaud, B. Darthout, R. Duval, O. 1995. Etude de l'enracinement du blé tendre d'hiver et du maïs dans les sols argilo-limoneux de Petite Beauce. *Etude et Gestion des Sols.* 2: 183-200.

143- Odile-Carisse, Ph. D. 2008. Comment bien utiliser ses fongicides – systémiques, translaminaires et cie dans l'oignon Agriculture et Agroalimentaire Canada 430, Boul. Gouin St-Jean-sur-Richelieu, (Québec) J3B 3E6.

144- Oliosio, A. 2006. Spatialisation des transferts sol-végétation-atmosphère de l'échelle de la parcelle à celle du paysage agricole en combinant modèles de fonctionnement de la végétation et du sol, modèles de transfert radiatif et systèmes de mesure de télédétection. Mémoire de HDR, spécialité "Physique de l'Environnement (Sciences de l'eau, Télédétection)", Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon (FRA). p330.

145- Olmedo-Areaga, O.B. Cantrell, R.G. 1995. Recurrent sélection for grain yield in Durum Wheat. *Crop Scio.* 35: 714-719.

- 146- Olsson, j. 2000. Modern Methods in Cereal Grain Mycology. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Microbiology *Uppsala*. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria 241. p37.
- 147- Paterson, P.J. Seaton, S. McLaughlin, J. Kibbler, C.C. 2003. Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections. *J. Clin. Pathol.* 56: 368-370.
- 148- Perlin, D.S. 2014. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis. *implications for patient management Drugs.* 74: 1573 - 85.
- 149- Peterson, S.W. 2006. Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Euopenicillium* Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7586 -7593.
- 150- Pitt, J.I. Christian, J.H.B. 1968. Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Appl. Microbiol.* 16: 1853-1858.
- 151- Pitt, J.I. Et Miscamble, B.F.1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection.* 58: 86-90.
- 152- Pfohl-Leszkowicz, A. 1999. Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. *Technique et Documentation*, Paris. p18- 35.
- 153- Prasad, B. Carver, B.F. Stone, M.L. Babar, M.A. Raun, W.R. et Klat, A.R. 2007. Genetic Analysis of Indirect Selection for Winter Wheat Grain Yield Using Spectral Reflectance Indices. *Crop science* 47: 1716- 1425.
- 154- Rabie, C.J. Lubben, A. Marais, G.J. et Jansen van vuuren, H. 1997. Enumeration of fungi in barley. *Int.J. Food Microbiol.* 35: 117-127.
- 155- Reiss, E. Tanaka, K. Bruker, G. Chazalet, V. Coleman, D. Debeaupuis, J.P. Hanazawa, R. Latgé, J.P. Lortholary, J. Makimura, K. Morrison, C.J. Murayama, S.Y. Naoe, S. Paris, S. Sarfati, J. Shibuya, K. Sullivan, D. Uchida, K. et Yamaguchi, H. 1998.

Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *international journal of food microbiology*. 36: 249-257.

156- Rémi, C. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris.

157- Riba, A. Bouras, N. Mokrane, S. Mathieu, F. Lebrihi, A. et Sabaou, N. 2010. Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food Chem. Toxicol.* 48: 2772-2777.

158- Riba, A. Sabaou, N. Mathieu, F. et Lebrihi, A. 2005. Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro- Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.

159- Rocchi, S. Reboux, G. Million, L. 2015. Résistance aux antifongiques azolés d'origine environnementale : quelles alternatives pour l'avenir? *Journal de Mycologie Médicale.* 25 : 249-256.

160- Rocher, F. 2004. Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : Evaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réaction de défense. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers. p163.

161- Ruel, T. 2006. Document sur la culture du blé, *Ed: Educagri.* p18.

162- Saitou, N. et Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

163- Satish, S. Raghavendra, M.P. Mohana, D.C. et Raveesha, K.A. 2010. In vitro evaluation of the antifungal potentiality of *Polyalthia longifolia* against some sorghum grain moulds. *Journal of Agricultural Technology.* 6: 135-150.

164- Sawinska, Z. et Malecka, I. 2007. Effect of seed treatment and foliar protection with fungicides on health status of winter wheat. *Plant Protect. Sci.* 43: 13-18.

165- Sayoud, R. et Benbelkacem, A. 1996. Situation des maladies des céréales en Algérie. In proceeding du symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires. 11-14 novembre (1996). Rabat, Maroc. 69-70.

166- Schabereiter-Gurtner, C. Selitsch, B. Rotter, M.L. Hirschl, A.M. Willinger, B. (2007), Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45: 906-914.

167- Selmi, R. 2000. Fin du mythe de l'autosuffisance alimentaire et place aux avantages comparatifs. *Revue Afrique Agriculture.* 280 : 23-30. IN: Evaluation de la qualité d'un germoplasmе de blé dur (*Triticum durum* Desf) : appréciation de l'aptitude technologique et biochimique. Ait Kaki, S. (2001). Thèse de Magistère. Uni Badji Mokhtar. Annaba.

168- Semal. Fraselle, J. Impens, R. Kummert, J. Lepoivre, P. Meulimans, M. Seilleur, P. Vendrevenen, J. et Viseur, J. 1993. traite de pathologie végétale .presse agronomique de gembloux belgique. p178, 181,185, 186,194.

169- Seng, P. Drancourt, M. Gouriet, F. La Scola, B. Fournier, P.E. Rolain, J.M. and Raoult, D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 49 : 543–551.

170- Simon, H. Françoise, R. Michel, B. Dominique, D. Christel, G et Eric, J. 1994. La protection des cultures. Londres, Paris, New York. Lavoisier-tec. p54.

171- Singh, G. 1999. Studies on seed borne fungi of mungbean (*Vigna radiata* L.) during storage and their control. Thesis. Institute of Agricultural Sciences, Banaras Hindu University.

172- Singh, J. Srivastava, S. Shikha. Sinha, H. et Bose, B. 2011. Studies on Seed Mycoflora of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Treated with Potassium Nitrate and its Effect on Germination During Storage. *Res. J. Seed Sci.* 4: 148-156.

- 173- Snelders, E. van der Lee, H.A.L. Kuijpers, J. Rijs, A.J.M.M. Varga, J. Samson, R.A. 2008. L'émergence de la résistance azole dans *Aspergillus fumigatus* et la propagation d'un seul mécanisme de résistance. *PLoS Med.* 5: 219.
- 174- Snelders, E. Camps, S.M.T. Karawajczyk, A. Schaftenaar, G. Kema, G.H.J. van der Lee, H.A. 2012. triazole Fongicides peut induire une résistance croisée aux triazoles médicaux dans *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE.* 7: 31801.
- 175- Soltner, D.1980. Les grandes productions végétales. *Edi. Collection des sciences et des techniques agricol* : 15-55.
- 176- Soltner, D.1998. Les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies. Sainte-Gemme-sur-Loire, Sciences et Techniques Agricoles.
- 177- Soltner, D.1999. Les Grandes Productions Végétales. 19<sup>èmes</sup> édition collection Sciences et Techniques Agricoles. p20-39-41-63-64.
- 178- Soltner, P. 2005. Les bases de la production végétales: La plante et son amélioration. 4<sup>ème</sup>Ed. Collection et Techniques Agricoles. p248.
- 179- Stensvold, C.R. Jorgensen, L.N. Arendrup, M.C. 2012. Azole-resistant invasive aspergillosis: relationship to agriculture. *Curr Fungal Infect Rep.* 6: 91-178.
- 180- Syngenta, 1998. Protection des plantes, Bale, Suisse, Edition 01.
- 181- Tabuc, C. Marin, D. Guerre, P. Sesan, T. et Bailly, J. 2009. Molds and mycotoxin content of cereals in south eastern Romania. *J. Food Prot.* 72: 662- 665.
- 182- Tahani, N. Serghini-Caid, H. Ouzouline, M. et Elamrani, A. 2008. Mycologie du blé tendre : qualité technologique du grain et conséquences sur les produits finis. *Rev. Biol. Biotech.* 7: 27-32.
- 183- Tahir, M. Ketata, H. et Amiri, A.1998. breedin of wheat (*Triticum aestivum*) for thermal stress tolerance for continental Mediterranean environments. *In proceeding for of the 9th international wheat genetic symposium.* 4: 95-97.

- 184- Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipowski, A. Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725–2729.
- 185- Tangwattanachuleeporn, M. Minarin, N. Saichan, S. Sermsri, P. Mitkornburee, R. Groß, U. Chindamporn, A. et Bader, O. 2016. Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Thailand. *Medical Mycology.* 00: 1-7.
- 186- Vandeputte, P. 2008. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida Glabrata*. Th : Biologie des organismes. p168.
- 187- Verreet, J.A. Klink, H. 2002. The biology of fungal pathogens. Vol. 1: Fungal pathogen and diseases of cereals. Department of Plant Pathology, Christian-Albrecht University. Kiel, Germany.
- 188- Walker, 2008. Le mode d'action des triazoles perspectives agricoles n° 345.
- 189- Withlow, L.W. & Hagler, W.M. 2001. Mycotoxin contamination of feedstuffs- An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Québec.
- 190- World Health Organisation (WHO), (2005). The W.H.O. recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification Ed. W.H.O. Library cataloguing-in-Publication. Data: 2-9.
- 191- Zahri, S. Farih, A. Badoc, A. et Douira, A. 2008. Efficacité de plusieurs fongicides contre la septoriose du blé. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 147: 39-48.



## *Annexe 1*

### *Composition des milieux de cultures*

- **Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Milieu utilisé pour la recherche de nombreux champignon

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

Laver, couper en morceaux la pomme de terre, les faire cuire, filtrer, ajouter l'agar, le glucose puis ajuster la quantité d'eau. Autoclaver 20 min à 121°C, (Rémi, 1997).

- **PDAac (Potato dextrose agar acidifié):** PDA + 1 ml d'acide lactique à 25% par flacon de milieu.

- **PDAr (Potato dextrose agar rose Bengal):** PDA + 1 ml du rose Bengal

- **Milieu Czapek-Dox Agar**

Milieu minéral utilisé souvent pour l'isolement et la conservation de nombreux champignons phytopathogènes, sa composition se présente comme suit :

NaNO <sub>3</sub>	2.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0g
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.0g
Kcl	0.5g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.01g
Saccharose	30g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

Le pH est ajusté à 6 et le milieu est autoclave pendant 20min à 121°C, la stérilisation s'effectue dans des flacons en verre avec des bouchons en métal (Rémi, 1997).

- **Gzapeck acidifié :** Gzapeck + 1 ml d'acide lactique à 25% par flacon de milieu.

- **Gzapeck rose Bengal:** Gzapeck+1ml du rose Bengal

- **Milieu Sabouraud dextrose agar**

Peptone	10g
Saccharose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

## *Annexe 2*

### **Protocole de la purification des réactions de séquences avec le Kit CleanSeq**

- 1- Retirer la/les Plaques de réaction de séquence. Placer sur un portoir plastique pour plaques 96 puits. Ajouter 10µl d'eau dans tous les puits avec une Pipette 10µl 8 canaux
- 2- Ajouter 10µl de réactif « Big Dye® Sequencing Clean up kit » dans tous les puits avec une Pipette 10µl 8 canaux
- 3- Ajouter 63 µl d'Ethanol 80° dans tous les puits avec une Pipette 100µl 8 canaux
- 4- Bien mélanger par Aspiration-Refoulement avec la pipette 100µl 8 canaux en réglant le volume de prise sur 100µl
- 5- Laisser incuber 3 – 5 min pour fixation des ADNs sur les billes magnétiques
- 6- Placer sur la Plaque 96 puits Magnétique dite « SuperMagnet » environ 1 – 2 min
- 7- Aspirer la totalité du liquide avec la pipette 100µl 8 canaux réglée sur le volume de prise de 100µl
- 8- Réaliser un lavage des billes en ajoutant 100µl d'Ethanol 80° dans tous les puits avec une MultiPipette 1000µl 8 canaux ou pipette automatique 1000µl
- 9- Aspirer la totalité du liquide avec la pipette 100µl 8 canaux réglée sur le volume de prise de 100µl
- 10- Réaliser un second lavage des billes en ajoutant 100µl d'Ethanol 80° dans tous les puits avec une MultiPipette 1000µl 8 canaux ou pipette automatique 1000µl
- 11- sécher 5 min pour évaporer l'éthanol 80°
- 12- .Ajouter 50µl d'eau dans tous les puits avec une Pipette 100µl 8 canaux
- 13- Retirer la plaque de séquences du « SuperMagnet et Laisser incuber 3 – 5 min pour élution des ADNs des billes magnétiques
- 14- Replacer la Plaque 96 puits de séquences sur le « SuperMagnet » environ 2 min pour bien séparer les billes magnétiques du liquide éluât contenant les séquences pures

## *Annexe 3*

### **Les séquences de la région ITS1 et ITS4 des isolats**

Séquence ITS1 et ITS4 de *P. griseofulvum*

>3T3\_A01\_01\_ITS1

CGGCTTYGAGTGAGGGCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTATTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAA  
CTGGCCGCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGT  
CTGAGTAAAAATATAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG  
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATTCCGGG  
GGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGTACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGG  
CCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT  
AAGCATATCTW

>3T3\_A01\_01\_ITS4

GGAGSTGGGWTCCTACCTGATCCGAGGTCACCTGGATAAAAAATTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCT  
ACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTACCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCG  
GAATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGG  
AATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTT  
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTA  
CAATCTTCAGACAGAGTTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTA  
AGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAAGGTAAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCAGTAAT  
GATCCTTCCGATC

Séquence ITS1 et ITS4 de *P. glabrum*

>3T3\_B01\_02\_ITS1

GAGTGAGGGCCTCTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTATTTGTACCTTGTTGCTTCGGTGCGCCCGCCTCACGGCCGCC  
GGGGGGCTTCTGCCCCGGGTCCGCGCGCACCCGAGACACTATTGAACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCATA  
AACTAAATAAGTTAAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC  
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATG  
CCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCCCCCGGGGACGGGTCCGAAAG  
GCAGCGGCGGCACCGAGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGC  
CGACAACCAATCATCCTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAG

>3T3\_B01\_02\_ITS4

GTWTCCTACCTGATCCGAGGTCACCTGAAAAAGGATGATTGGTTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGCCTACAGAG  
CGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACTCGGTGCCGCCGCTGCCTTCGGACCCGTCCCCGGGGGGAC  
GGAGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGG  
CGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCA  
TCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTTAGTTTATGCTCAGACTGCAATCTTCAGACAG  
AGTTCAATAGTGTCTCCGGTGCGC GCGGACCCGGGGCAGAAGCCCCCGCGGCCGTGAGGCGGGCGCACCGAA  
GCAACAAGGTACAATAAACACGGGTGGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCAGTAATGATCCTCCGAN

Séquence ITS1 et ITS4 d'*Aspergillus flavus*

>3T3\_C01\_03 ITS1

AGTGWGGGTTCCCTAGCGAGCCACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATG  
GCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGA  
GTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG  
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCTCCCTCTCCGGGG  
GGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGCGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAG  
GCCCCGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC  
TTAAGCATACA

>3T3\_C01\_03 ITS4

GGATCCTACCTGATCCGAGGTCACCTGGAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGG  
GTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGG  
GGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCA  
GGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTGCTGCG  
TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTAC  
TAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGC  
GGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTAC

Séquence ITS1 d'*Aspergillus tubingensis*

>3T3\_D01\_04 ITS1

GTGCGGGTCTTTGGGCCACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTGCGCCGCC  
GGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCTCGCCGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCT  
GAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
ATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG  
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGG

GGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGA  
TTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACATTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT  
AAGCATATCATAA

>3T3\_D01\_04\_ITS4

GRAGCGGGATCCTACCTGATCCGAGGTCACCTGGAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTA  
CAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGG  
AGAGGGGGACGGCGACCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGA  
ATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTG  
CTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACT  
GCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGCCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGGC  
GCCGACAAGCGGGCGGGCCCCGCCAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGC  
ACTCGGTAATGATCCTTCCGCATC

Séquence ITS1 de *Trichoderma harzianum*

>3T3\_E01\_05\_ITS1

CGAGTTACACTCCCAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTGCAG  
CCCCGGACCAAGGCGCCCCGCCGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGA  
GCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA  
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTT  
GGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAG  
TAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGA  
TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCTG

Séquence ITS1et ITS4 d'*Alternaria alternata*

>3T3\_G01\_06\_ITS1

GWTGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATCACCCCTGTCTTTGCGTACTTCTTGTTT  
CCTTGGTGGGTTGCCCCACCACTAGGACAAACGTAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAAT  
TACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTG  
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGT  
CATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGC  
AGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATCAAGCCTTTTT  
TTCAACCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAGGCSSGRRG

>3T3\_F01\_06\_ITS4

GGATCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTGATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGA  
CTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGA  
CGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA  
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGA  
TGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTT  
TACGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCA  
AGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCCTTACGGAAGG  
ATCATTACACAAATATGAAGGCGGSéquence

ITS1 et ITS4 de *Botrytis cinerea*

>3T3\_C02\_07\_ITS1

GGTMTGCCCCAAGGGTAGACCTCCACCCCTGTGTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTTGGGCCTTGTA  
TGCTCGCCAGAGAATACAAAACCTTTTTTATTAATGTGCTGCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGA  
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC  
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTCACCCTCAAGCTT  
AGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTCTGAACGTAGTAA  
TATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA  
TACCCGCTGAACTTAAGCA

>3T3\_C02\_07\_ITS4

GTWTCCTACCTGATCCGAGGTCACCATAGAAAAATTTGGGTTTTGGCAGAAGCACACCGAGAACCTGTAACGAGA  
GATATACTACGTTCAGGACCCAGCGGCGCCGCACTGATTTTAGAGCCTGCCATTAAGTACTGACATAGACTCAATACCAA  
GCTAAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAA  
GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAG  
AGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTATATAGTACTCAGACGACATTAATAAAAAGAGTTTTGGTATTCTCTGGCG  
AGCATACAAGGCCCAAAGGCAGCTCGCCAAAGCAACAAAGTAATAATACACAAGGGTGGGAGGTCTACCCTTTCGG  
GCATGAACTCTGTAATGATCCTTCCGCAT

Séquence ITS1 et ITS4 d'*Aspergillus fumigatus*

>3T3\_C03\_08\_ITS1

TGAGTGCCTCTGSGYCCACCTCCCCCGTGTCTATCGTACCTTGTGCTTCGCGCCGGCCGCGTTTCGACGGCCGCCG  
GGGAGGCCTTGCGCCCCCGRCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCCGAAAGTATGCAGTCTGA  
GTTGATTATCGYAATCCGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCCATGAAGAACGCAGCGAAATGC

GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCRAGTCTTTKAACGCWCATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG  
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGYTTGTGTGTTGGGCCCCCGYCCCCCTCTCCCGGGGGAC  
GGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGG  
CCGGCGCCAGCCGACACCCAACCTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCMGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC  
ATATCATAA

>3T3\_C03\_08\_ITS4

GATCCTACCTGATCCGAGGTCACCTTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCAG  
GTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCCGGGCCGTCCCCCGGGAGAGGGG  
GACGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAG  
GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTT  
CTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACT  
TCAGAACAGCGTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGCAAGGCCTCCCCGGCGGCCGTCGAA  
ACGGCGGGCCCCCGGAAGCAACAAGGTACGATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTA  
ATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCYWACGGAAGGATCATTACCGAGTGAGG

Séquence ITS1 et ITS4 de *rhizopus oryzae*

>3T3\_A02\_09\_ITS1

GTTAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATTTGGCTGAGAGACTCAG  
ACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCATAATAAACCTAG  
AAATTCAGTATTATAAAGTTTAATAAAAAACAACCTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTA  
GCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGTTT  
TTCTATAGAGTACGCCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATTTGTTTATGTGGTGATGGGTGCGATCGCT  
GTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGTGATTTTCTGTCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAG  
GATCTTTTTTTTTGGTTCGCCAGGAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACCTATGATCTGAAGTCA  
GGTGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCTAA

>3T3\_A02\_09\_ITS4

GAGTGGATCCACCTGACTTCAGATCATAGTTTGAAAGTTACTGGATTATACTCTTGTACTTTACTTCTGGGCGAACC  
AAAAAAAAAGATCCTGAGACCAGCGTAATATTCCTGCCTAGCAAGCCAGACAGAAAATCACACACATTTAGGTGCT  
CACTGTAATAAAAACAGCGATGCGACCCATCACACATAAAACAAATGTTATGTGTGGGTTTGTGATGATACTGAAGCA  
GGCGTACTCTATAGAAAAACCATAGAGTGCAAGCTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATATGCAATTCACAC  
TAGTTATCGCACTTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCATTGTTAAAAGTTGTTTTTATTAACT  
TTATAATACTGAATTTCTAGGTTTATTATGAAGGGTACTCCTGAAACCAGGAGTGGCATCGATCAAACCCAGATAG

GTCTACCCATGACCAGTCTGAGTCTCTCAGCCAAATTTTCACAGTGTAGAAGCAATCACTTACCCCAGAGGAAACCCCT  
AAGGTAAGGCGCTTTAACATAATTAATGATCCTTCCGAT

Séquence ITS1 et ITS4 de *Cladosporium cladosporioides*

>3T3\_B02\_10\_ITS1

GTGACCCGGTCTACCACCGGGATGTTTCATAACCCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGG  
GCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTCGCTAACTTTCGAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAATAAACT  
TTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT  
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTC  
ACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACCGGTCGCGCCGCTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCC  
CTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAACAACCCCATTTCTAAGGTTGAC  
CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCTA

>3T3\_B02\_10\_ITS4

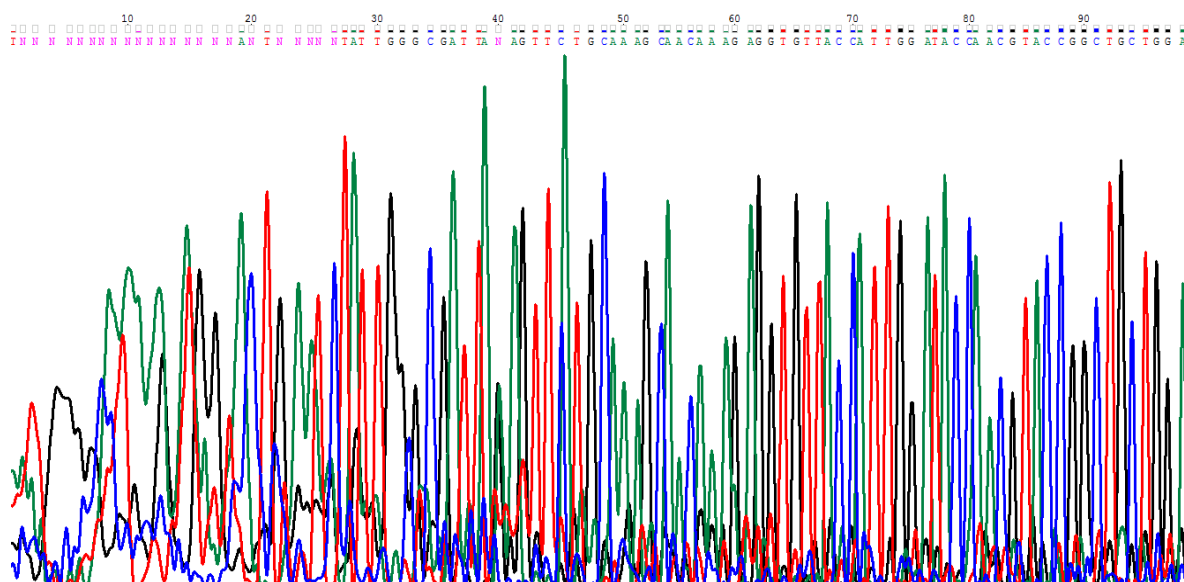
YCYTACCTGATCCGAGGTCACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTT  
TCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTTCGATTTGAGGCACGCGGGGACCGCGTTGCCCAATACCAAG  
CGAGGCTTGAGTGGTAAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG  
ATTCGATGATTCAGTGAATTCTGCAATTCACATACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA  
GATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGCCAC  
CCGGAGCCCCCGCCGAAGGCAGGGTCGCCCCGAGGCAACAGAGTCGGACAACAAGGGTTATGAACATCCCGG  
TGGTTAGACCGGGTCACTTGTAATGATCCCTCCGATG



## Annexe 4

### Séquences brutes et forme Fasta des six isolats résistantes

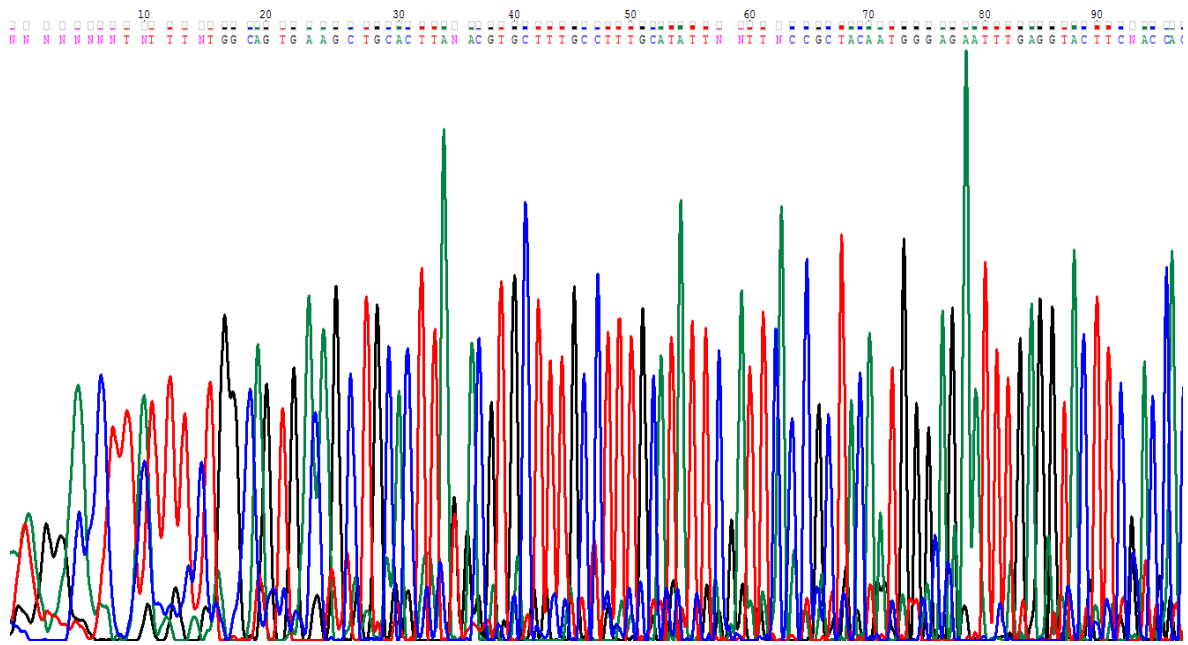
-Séquences brutes plus forme Fasta de *P. griseofulvum*



>T1-cds1

```
TNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANTNNNNNTATTGGGCGATTANAGTTCTGCAAAGCAAC
AAAGAGGTGTTACCATTGGATACCAACGTACCGGCTGCTGGAATCCAGTCTGGTTTGC
AAAGAAGGCGCCTCCCATCGCGCCAGTAGGGTCGTGGGAATAAGGATTGGCAGAAAC
AGGACCAACGGCACCAGGAGTCATGGGAGCTGGGGTAGTCACAAAAGGATCAAATG
CACCCGTGGGGGTGATACCTCCATTTCATTGCCCTGAAGTGGTGCTGCGATTAA
```

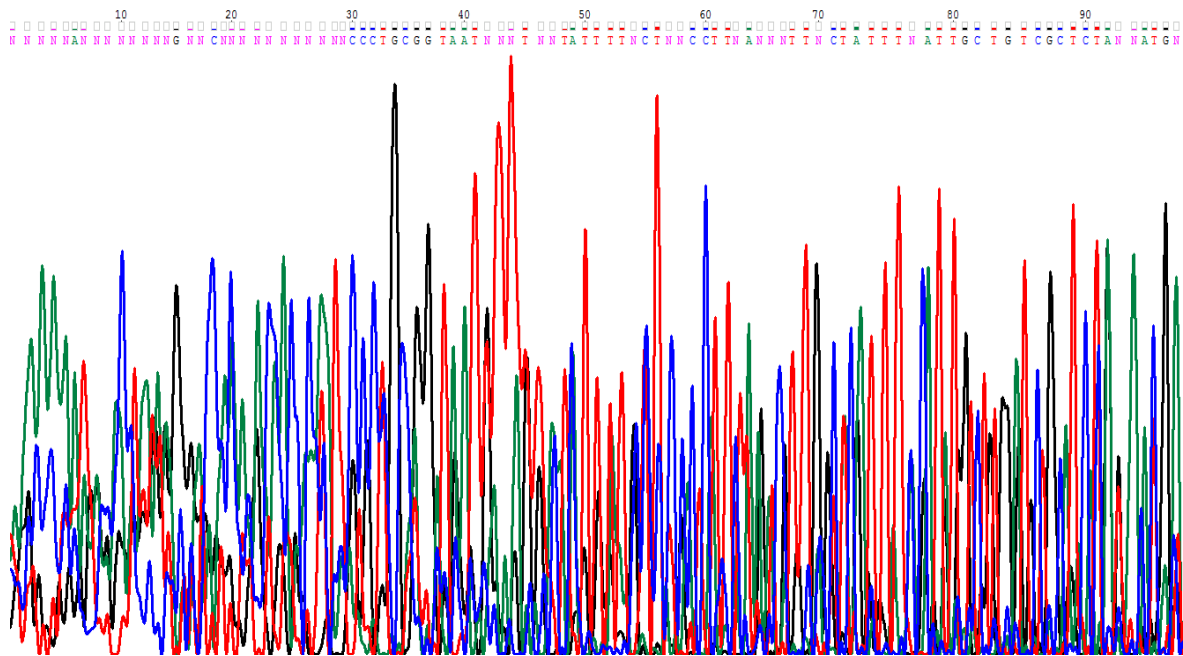
-Séquences brutes plus forme Fasta de *P. glabrum*



>T2-cds1

NNNNNNNNNTNTTTNTGGCAGTGAAGCTGCACTTANACGTGCTTTGCCTTTGCATATTN  
NTTNCCGCTACAATGGGAGAATTTGAGGTACTTCNACCACTATGTTTTCCACTTCTTTT  
TGTGAATAAATAGAATCGTCCTTCGGGCTGGGCCTGGAATTACAATGCCAAAAAAAAG  
AATTGNNTGAGTGANAATACNCTGGGTGCTTCTTGAAGTTCTACTGTCGTGACTTACTG  
ATACAATGCTTCTGGTCATTTTATTTTAATTTCTTCCCCTTCAATAANGCTCGAGTATTC  
CGCCTAGAGTGGAAAGCTATAGATGGCTTCCTCATGGTCAGATCACCCCTGAAGTGGT  
GCTGCNATTAA

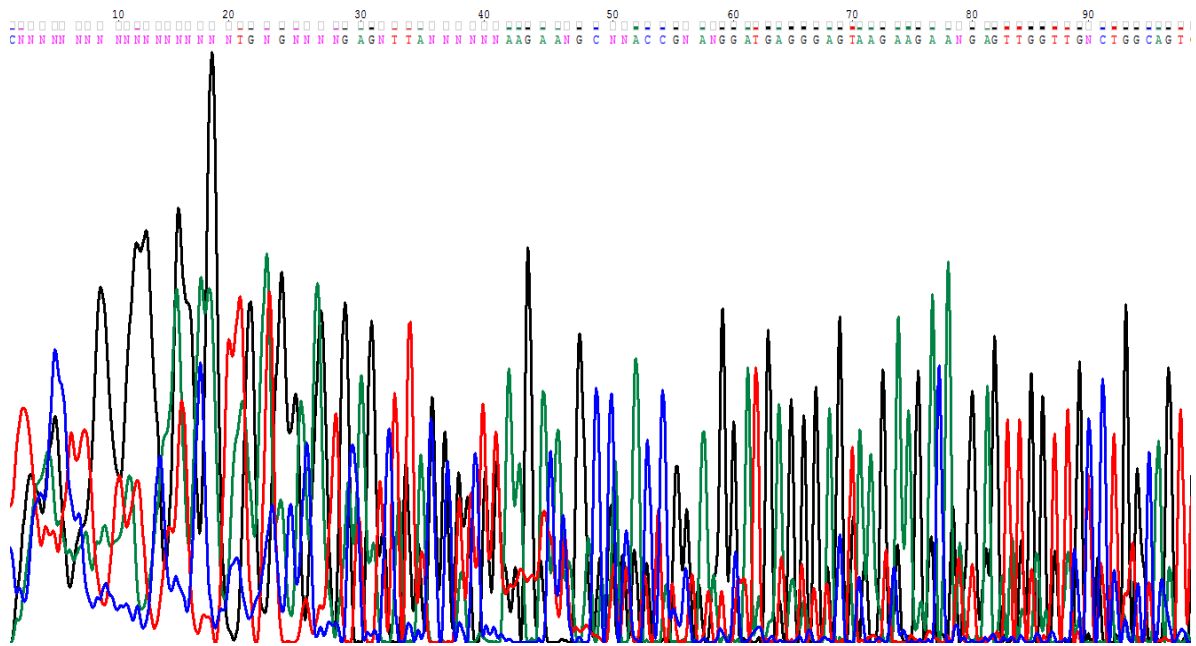
-Séquences brutes plus forme Fasta *d'A.flavus*



>T3-cds1

```
NNNNNANNNNNNNNNGNNCNNNNNNNNNNNNCCCTGCGGTAATNNNTNNTATTTTNCCT  
NNCCTTNANNNTTNCTATTTNATTGCTGTCGCTCTANNATGNAATTTTCTGCCGGNGA  
AATGATTGCCTTCTGAN TTCNAGGTNCAGN TTGNACTGTCTTATANAATATGANCTNN  
AAGGTAANNNGNTTNNGGNGACAGNGCTGCAGTGNTANN TGGAGCCNNGNCAGTGA  
GGGCANTGAAAGANC GCCTTTCTGAATNNATGCATCTNNNNGANGCGCCATANNGNT  
NNNTGCANGTTGCTNNTNANCNNTAATGNCCGTNANGNTNGNAGGGCTGAANNNGN  
GCTGNGATTATGCNTTCNNNTTGTTTCANTTCTN NANNACAGTGAGCCNNCATTGTGA  
ANANATNGNGTCTGNATANNGNCACTACCNNACACCTAGTNCNCNCANTGATCTCTA  
TNGANGANCNTATTCTCCATATGNTCCNNTCNTGTTGCTATAGTCTTNGNCTTTTTNCT  
TTTNTTTNNNTTCGGGGGAGGANCCCNAN
```

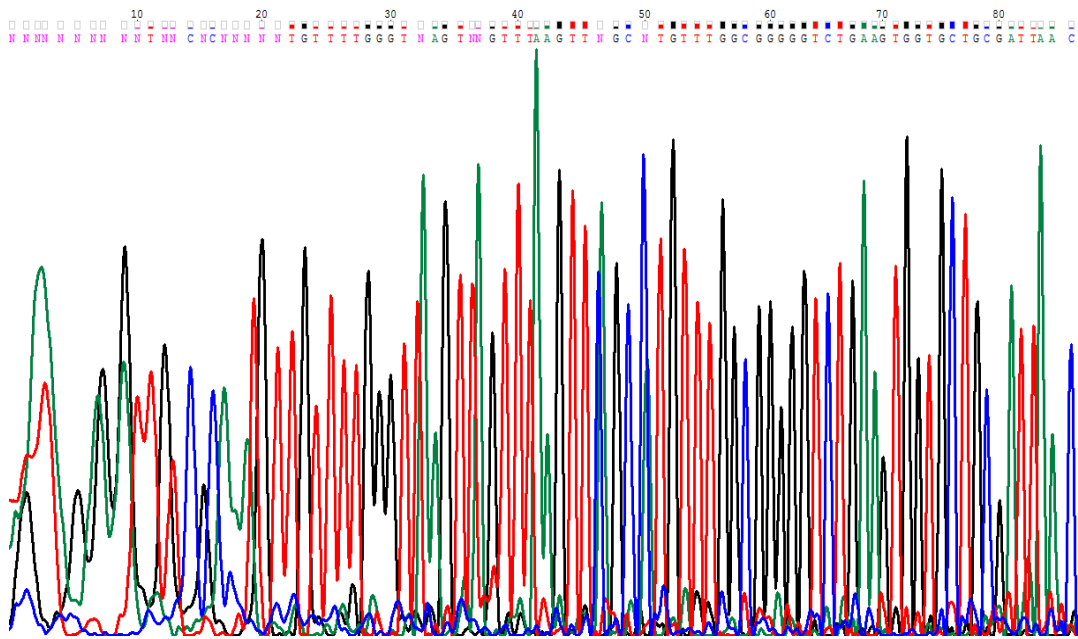
-Séquences brutes plus forme Fasta *d'A. tubingensis*



>T4-cds1

CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGN GNNNGAGNTTANNNNNNAAGAANGCNACCGN  
ANGGATGAGGGAGTAAGAAGAANGAGTTGGTTGNCTGGCAGTGGATGGACTGNTAA  
ATACTAGTCANNGGGGNCANN TGACTGGGCAGANNANNCANGGCAGGCCTGGTTCG  
GCTTGGCAGGTNCNAAGTGGAGCTTCGAGAAANTCCAGTCGGNCGAGATGGACAGG  
AATAGTATCGGAGACACGTTAGTTAACGATGCTACTAGTTTAGTCTTTCTCAAGNACG  
GAGTATTCCTAGCACACATTGTGGCACTGCACTGCCATCCTACCACCACTCGGTACT  
AGTACGACTTGACTACTTTCTAGTATACANCGATACTCACTATTTGCAGGTACGGATA  
ACCGGAGTTTGA ACTGTCTTGGATGAATGGCCCTGAACCTTGNGGACCANTTCTTTGG  
CTCATCCCAGATGGGGAGGGCAGCAAGCGACGGAGGTCCCAACTAAGGTATTGTCAA  
CGTCAGCATCAGAGNCCAGCCATTGCGCCANTTCCCTTGTAGAATAGCGCTGGATGA  
ATGCNGNACCCCAATTGTCTAGGCTTTTAGGGTCTGCAGTCGACACATACTTGATAGA  
TAATAAATAGATAGATAACTGAGTATTTAAAAGGNTGAAGGGAGTGAGGGGTATCT

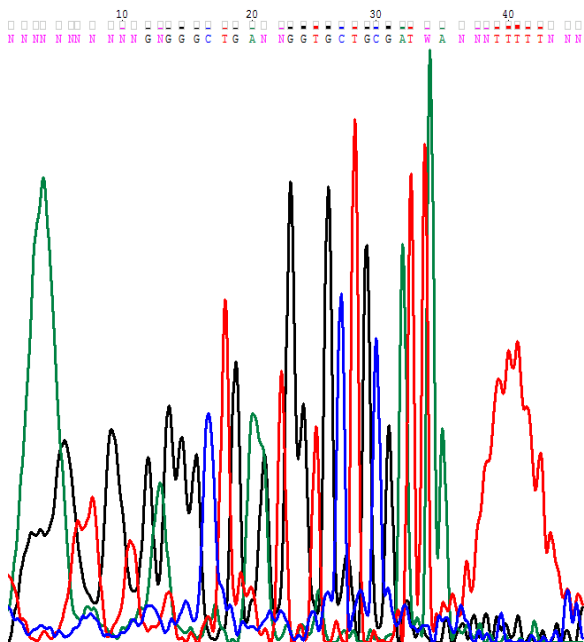
-Séquences brutes plus forme Fasta de *T.harzianum*



>T5-cds

NNNNNNNNNTNNCNCNNNNNTGTTTGGGTNAGTNNGTTTAAGTTNGCNTGTTTGG  
CGGGGTCTGAAGTGGTCTGCGATTAAC

-Séquences brutes plus forme Fasta d'*A.alternata*



>T6-cds1

NNNNNNNNNNNGNGGGCTGANNGGTGCTGCGATWANNNTTTTNNN

**ZAAMOUCI Ahlem**

**Date de soutenance : / /**

**Thème :**

**Caractérisation moléculaire et par MALDI-TOF MS des espèces fongiques toxigènes inféodées aux céréales et mise en évidence de l'impact de l'utilisation des antifongiques azolés sur la résistance des souches**

**Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle**

**Option : Bioprocédés et Biotechnologie, Applications Mycologiques**

Les céréales d'hivers, en particulier le blé dur, demeurent l'aliment de base des régimes alimentaires algériens et revêtent une importance stratégique dans la nutrition humaine et l'alimentation animale. De nombreuses maladies fongiques peuvent attaquer la culture céréalière, notamment, le blé dur. Ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles. Par ailleurs, ces moisissures phytopathogènes sont également responsables de pathologies humaines. Le recours au traitement à base de pesticides est inévitable et protège la plante de toute contamination externe. La meilleure protection phytosanitaire de la culture de blé s'assure par deux types de produits : fongicide et insecticide. En terme de fongicides, les incontournables triazoles ont fait leur preuve et ce, depuis plus de trente ans. Les triazoles étant des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IDMs). Actuellement les moisissures deviendraient résistantes dans l'environnement, en raison de l'utilisation excessive des fongicides. Le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les moisissures étant la mutation du gène *cyp51* codant pour les 14 alpha stérol déméthylase. Les antifongiques azolés inhibent cette enzyme, conduisant au blocage de la biosynthèse de l'ergostérol et par conséquent à une déplétion en ergostérol et à une accumulation de métabolites toxiques. Dans ce contexte nous avons réalisé une étude comparative des échantillons de semences, feuilles et épis de blé dur ; traités par les fongicides azolés : Raxil® 060 FS, l'Artea®330EC et l'Amistar® Xtra ; et d'autres échantillons non traités et ce, afin d'évaluer l'efficacité des triazoles et le degré de protection de la culture de blé après un traitement fongicide dans la wilaya de Constantine (Algérie). Selon l'analyse mycologique des échantillons, 114 souches ont été isolées. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus dominantes. Après identification moléculaire et par Maldi-Tof MS, six espèces résistantes aux traitements ont été sélectionnées pour l'étude des effets des fongicide, à savoir, *A. flavus*, *A. tubingensis*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *T. harzianium* et *A. alternata*. L'étude de la sensibilité de ces isolats porte dans un premier temps sur l'évaluation de l'activité *in vitro* des fongicides, décrits précédemment, par technique de diffusion. En complément, Les résultats obtenus et validés par une analyse statistique révèlent que les fongicides testés entraînent une diminution du recouvrement pycnidial par rapport aux témoins. Par ailleurs, la détection des mutations de résistance dans le gène *cyp51A* des isolats a été effectuée par l'analyse de ce dernier. Les résultats obtenus ont été traités par des approches bioinformatiques afin de les exploiter.

**Mots clés : Blé dur, Fongicides triazolés, MALDI-TOF MS, Résistance, CYP 51A.**

**Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne**

<b>Président :</b>	<b>M<sup>r</sup>. DEHIMAT L.</b>	<b>Professeur</b>	<b>UFMC 1</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>M<sup>me</sup>. MIHOUBI I.</b>	<b>Professeur</b>	<b>UFMC 1</b>
	<b>M<sup>r</sup>. PICOT S.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. Claude Bernard-Lyon 1</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>M<sup>r</sup>. GUECHI A.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. Farhat Abbas – Sétif</b>
	<b>M<sup>me</sup> ALATOU R..</b>	<b>M.C.A.</b>	<b>UFMC 1</b>