

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى إسمطبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la nature et de la vie (SNV)

Département de biologie

Laboratoire de.....

THESE de DOCTORAT

Spécialité : Science de la vie

Intitulée :

Caractérisation mycotoxicologique des *Fusarium* et identification des espèces toxigènes des moisissures dans les blés (*Triticum sp.*) locaux et importés. Etude du déoxynivalénol (DON).

Présentée par : Serra DJAABOUB ep GOURI

Le 06/04/2021 à l'amphi de la bibliothèque

Devant le jury :

Président	BACHIR RAHO Ghalem	Pr	Université de Mascara
Examineur	BOUNGAB Karima	Pr	Université de Mascara
Examineur	LAZOUNI Hammadi	Pr	Université de Tlemcen
Examineur	MAKHOLOUFI Ahmed	Pr	Université de Béchar
Directeur de thèse	MOUSSAOUI Abdallah	Pr	Université de Béchar
Co-Directeur de thèse	MEDDAH Boumedienne	Pr	Université de Mascara

A mes chers parents.

« Le bonheur, c'est avoir une mère qui nous aime, un père pour nous conduire, avoir encore ses parents à l'âge d'homme pour les voir sourire à nos efforts, et voir nos parents applaudir à nos succès »

Henri Frédéric Amiel, 1852

Merci pour tout.

Serra.

AVANT – PROPOS

Si la réalisation d'un travail de thèse tel que le nôtre incombe avant tout à son initiateur, il ne reste pas moins qu'il a nécessité, pour être mener à bien, la participation d'un nombre non négligeable de personnes qui, chacune pour sa part, a contribué, par l'apport d'une pierre, à la construction de l'édifice. Il serait par conséquent indélicat, de ma part, de ne pas mentionner leur contribution et reconnaître que nous restons leur obligé.

C'est pourquoi, même si nous ne pouvons citer toutes les personnes qui nous ont gratifié de leur aide tout au long de notre travail de recherche afin de le mener, nous avons néanmoins, le devoir de leur exprimer, ici, nos remerciements les plus sincères et notre reconnaissance éternelle. Que ce travail qui est autant le notre que le leur, en soit perçu ainsi.

Par ailleurs, il serait inconvenant de ne pas dire aux principaux acteurs qui ont directement participé à la réalisation de cet édifice, aussi modeste soit-il, combien il nous est agréable de leur présenter notre reconnaissance pour ce qu'ils ont accompli. Que nos remerciements et notre gratitude soient, de ce fait, exprimés plus particulièrement à :

- M^r. A. MOUSSAOUI, Professeur à l'Université de Béchar, qui a bien voulu m'honorer en acceptant d'être le directeur de la présente thèse. Pour m'avoir guidé et prodigué les conseils et l'appui dont j'avais besoin, lui qui a montré une disponibilité sans relâche en tout moment durant mon travail. Pour ses orientations et ses conseils, dont il m'a gratifié, je voudrais qu'il trouve, ici tout mon respect et ma reconnaissance.

- M^r. B. MEDDAH, Professeur à l'Université de Mascara, qui m'a honoré en acceptant d'être le Co-directeur de ce travail de recherche. Pour ses conseils, ses orientations et sa disponibilité en tout moment, je désirerais qu'il trouve, ici tout mon respect.

- M^r. M. BELABID, Professeur à l'Université de Mascara, qui m'a honoré en acceptant de présider ce jury.

- M^{me}. K. BOUNGAB, Maitre de conférences A à l'Université de Mascara, M^r. H. LAZOUN, Professeur à l'Université de Tlemcen, M^r. A. MAKHLOUFI, Professeur à l'Université de Béchar et M^r. G. BACHIR-RAHO, Professeur à l'Université de Mascara pour avoir bien voulu faire partie de ce jury et accepter d'examiner le présent travail malgré leurs nombreuses responsabilités.

- *M^{me}. TOUMI, chef de service à la Coopérative des Céréales et des Légumes Secs (CCLS) de Béchar, pour sa disponibilité lors de nos différentes sollicitations en matière d'échantillonnage, sa parfaite connaissance du terrain et son aide.*

- *M^r. A. RIBA, Professeur à l'Université de Boumerdes, M^r. N. BOUSSOUAR, Maître de conférences à l'Université de Béchar et M^r. R. EL KHATIB, Professeur assistant à l'Université canadienne de Dubaï, pour leur disponibilité et leur aide scientifique. Qu'ils trouvent, ici, mes sincères remerciements.*

- *Mes remerciements vont également au personnel du laboratoire de recherche « valorisation des ressources naturelles et sécurité sanitaire des aliments du Sud-ouest algérien » et à ceux des laboratoires pédagogiques de biologie (LPB) de l'université de Béchar, notamment aux ingénieurs et masterants.*

Je dédie ce modeste travail, à ma précieuse famille dont l'appartenance m'enchante et m'honore.

- *A mes très chers parents qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant, m'ont soutenu sur tous les plans et prodigué aide morale et intellectuelle, qu'ils en soient remerciés. Sans vous je ne serais jamais arrivé là où je suis. Je voudrais que vous sachiez que mon amour et mon affection pour vous sont éternels. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance. Puisse le tout Puissant vous accorder santé, bonheur et longue vie. Je n'omettrai pas de gratifier mon père pour son aide en matière de correction, je lui en suis profondément reconnaissante.*

-*Que mes très chères sœurs Soror, Imane, leurs époux Adel et Sherif, Islam et Randa, ainsi que mon frère Salah Eddine et son épouse Kaouter Narimene qui m'ont, sans cesse, encouragé tout au long de mes études et m'ont été d'un apport considérable durant les moments les plus incertains trouvent, dans cet avant-propos, tous les sentiments de fierté dont ils font l'objet en moi.*

-*Que mon très cher époux Saif GOURI qui a fait avec moi tout le chemin qui m'a conduit à ce gué, m'a soutenu en tout temps et principalement durant les moments difficiles, trouve ici mes sentiments les plus tendres et les plus profonds. Sa présence, sa contribution à mon travail, son soutien moral ainsi que sa présence de tous les jours m'ont été d'un grand secours. Puisse le bon Dieu nous procurer santé et longue vie.*

- A mes chers petits, Iyad, Yahia et Jad qui sont la raison de mon existence, la source de ma joie et la lumière de ma vie, je dédis cette thèse. Que Dieu vous bénisse et vous procure, santé et longue vie mes fils.

- A la mémoire de mon beau-père que j'aurais tant aimé voir à mes côtés en ce jour particulier. Que Dieu ait son âme et l'accueille dans sa sainte miséricorde.

- Que ma belle-mère et tous les membres de ma belle-famille trouvent ici mes sincères remerciements et mon affection pour l'encouragement qu'ils m'ont accordé et la présence dont ils ont fait preuve.

- Je n'omettrai pas de présenter mes meilleurs sentiments à l'ensemble des membres de ma grande famille : Djaaboub, Guellour et Gouri ainsi qu'à toutes mes amies, particulièrement : M^{me}. Wassila KOUDJIL-FELLAH, M^{me}. Nora SEDDIKI, M^{me}. Lemya SEDDIKI, M^{me}. Nawel Attoui et M^{me}. Khadidja FELLAH à qui je dédie ce modeste travail en guise de remerciements pour leurs encouragements. Qu'ils trouvent, ici, l'expression de mes sentiments les plus sincères et mon amitié éternelle.

- Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux que j'aurais pu omettre de citer et qui de près ou de loin m'ont aidé, encouragé et soutenu.

Serra.

RESUME

Notre travail a pour objectif, dans un premier temps, l'identification des espèces fongiques toxigènes et particulièrement celles responsables de la sécrétion du déoxynivalénol sur les blés tendres et durs locaux et importés stockés dans la région de Béchar, et la recherche du DON par CCM et Elisa quantitative. Et dans un second temps, trouver des solutions nous permettant de lutter, voire prévenir la contamination des blés par *Fusarium graminearum* Chemotype DON, notamment, par la lutte biologique en utilisant d'autres espèces fongiques et des bactéries lactiques autochtones des mêmes biotopes.

Les résultats obtenus montrent que les blés analysés sont légèrement acides voire acides ($5,41 < \text{pH} > 5,96$) et très peu hydratés ($5,68 < \% \text{TE} > 8,65$) ; ainsi qu'ils abritent une flore fongique très abondante et diversifiée. Elles appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* et *Ulocladium*. Le blé local est dominé par les espèces aspergillières et pénicilliennes, pendant que le blé français est dominé par les espèces fusariennes et pénicilliennes. De plus, nous avons enregistré de fortes quantités en DON sur le blé importé (62,96% de BT et 55,56% de BD), dépassant jusqu'à huit fois les normes européennes. Par ailleurs, la croissance mycélienne des isolats de *F. graminearum* dépend des facteurs de l'environnement notamment, la température ($5 < 20-25 > 30$), le pH ($2 < 7 > 11$), l' A_w (entre 0.995 et 0.98) et la concentration en NaCl (corrélation négative), et également, des autres espèces fongiques qui sont en compétition avec un taux d'inhibition qui peut atteindre jusqu'à 98%. D'autre part, nous révélons que les bactéries lactiques isolées des mêmes échantillons des blés notamment, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus spp*, *Wesseilla confusa* et *Tetragenococcus halophilus* s'avèrent d'importants candidats pour la lutte biologiques vis-à-vis de *F. graminearum* Chemotype DON. Ces espèces ont inhibé totalement la croissance mycélienne via des métabolites extracellulaires de nature gluco-péptidique et des phénols.

En guise de conclusion, nous pensons que cette étude ouvre la porte à plusieurs perspectives de recherche dans le domaine de la sécurité sanitaire et de la lutte biologique.

Mots clés : Moisissures toxigène, Blés, *Fusarium graminearum*, déoxynivalénol, lutte biologique.

ABSTRACT

The aim of the present study was, on the one hand, the identification of toxigenic fungi particularly, those responsible for the secretion of deoxynivalenol on local and imported wheat (soft and durum wheat); on the other hand, quantify DON on wheat stored in Bechar province, by CCM and quantitative Elisa. In the second part, find solutions that allow us to inhibit moreover, to prevent fungal contamination and their associated toxins, by biological control using other fungal species and/or autochthon lactic acid bacteria.

The results obtained show that samples of wheat are slightly acidic to acidic (5,41<pH>5,96) and dehydrated (5,68<TH>8,65); and contain abundant and diverse fungal flora. They belong to the genus of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* and *Ulocladium*. Local wheat was dominated by *Aspergillum* and *Penicillium* species; in comparison, French wheat was dominated by *Fusarium* and *Penicillium* species. In addition, we recorded high quantity of DON content in imported wheat grains (62,96% for SW and 55,56% for DW), exceeding European standards up to eight times. On otherwise, the mycelial growth of isolates of *F. graminearum* depends on environmental factors in particular, temperature (5<20-25>30), pH (2<7>11), Aw (between 0.995 and 0.98) and NaCl concentration (positive correlation), and on other fungal species, which are in competition and can stop the growth of *F. graminearum* with 98%. On the other hand, we reveal that lactic acid bacteria including, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus spp*, *Wesseilla confusa* and *Tetragenococcus halophilus* can be as promising candidate for the biological control of *F. graminearum* Chemotype DON. These species can stop totally the growth of the pathogen *via* gluco-peptidic extracellular metabolites and phenols.

In conclusion, we consider that this study opens several research perspectives in the domain of health security and biological control.

Key words: Toxinogenic molds, wheat, *Fusarium graminearum*, deoxynivalenol, biological control.

TABLE DES MATIERES

Avant-propos.....	ii
Résumés.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des abréviations.....	xii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xvi
Introduction	2

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Synthèse bibliographique.....	7
----------------------------------	---

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Première partie : Identification et caractérisation des moisissures des blés.....	40
II.1.1 Matériel biologique.....	40
II.1.2 Analyses chimiques des blés.....	41
II.1.2.1 Détermination du taux de la teneur en eau.....	41
II.1.2.2 Détermination du pH.....	41
II.1.2.3 Analyses statistiques	41
II.1.3 Analyses mycologiques	41
II.1.3.1 Isolement et dénombrement de la flore fongique totale.....	41
II.1.3.2 Analyses statistiques	42
II.1.3.3 Purification et conservation des isolats	42
II.1.3.4 Caractérisation morphologique.....	42
II.1.3.5 Caractérisation physiologique	44
II.1.3.6 Caractérisation mycotoxicologique.....	46
II.1.3.6.1 Recherche des <i>F. graminearum</i> Chemotype DON.....	46
II.1.3.6.2 Recherche du DON au niveau du substrat.....	47
II.2 Seconde partie : Biocontrôle de <i>Fusarium graminearum</i>	48
II.2.1 Etude des interactions entre les espèces fongiques.....	49
II.2.1.1 Confrontation par contact direct.....	49
II.2.1.2 Confrontation par contact direct à distance de temps	49
II.2.1.3 Confrontation par contact direct à distance d'espace.....	50
II.2.1.4 Taux d'inhibition.....	50
II.2.2 Activité antifongique des bactéries lactiques.....	51
II.2.2.1 Isolement des bactéries lactiques.....	51
II.2.2.2 Purification des isolats lactiques	51

II.2.2.3 Conservation des isolats lactiques	51
II.2.2.4 Revivification des souches lactiques	51
II.2.2.5 Caractérisation morphologique	51
II.2.2.6 Caractérisation physiologique.....	52
II.2.2.7 Caractérisation biochimique.....	52
II.2.2.8 Caractérisation d'intérêt sanitaire.....	56
II.2.2.9 Caractérisation technologique et enzymatique.....	57
II.2.2.10 Étude de l'activité antifongique des bactéries lactiques.....	59
II.2.2.11 Activité anti-DON	61

CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III.1 Première partie : Identification et caractérisation des moisissures des blés.....	64
III.1.1 Caractérisation chimiques des blés.....	64
III.1.1.1 Caractérisation chimiques des blés durs locaux.....	64
III.1.1.2 Caractérisation chimiques des blés durs importés.....	65
III.1.1.3 Caractérisation chimiques des blés tendres locaux.....	65
III.1.1.4 Caractérisation chimiques des blés tendre importés.....	65
III.1.2 Caractérisation mycologiques des blés.....	66
III.1.2.1 Flore fongique	66
III.1.2.2 Caractérisation morphologique	72
III.1.2.3 Caractérisation physiologique de <i>F. graminearum</i>	115
III.1.2.3.1 Effets des différentes températures.....	115
III.1.2.3.2 Effets des différents pH.....	115
III.1.2.3.3 Effets des différentes A_w	115
III.1.2.3.4 Effets de différentes concentrations en NaCl	115
III.1.3 Caractérisation mycotoxicologique.....	120
III.1.3.1 Recherche des souches de <i>F. graminearum</i> productrices de déoxynivalénol (DON).....	120
III.1.3.2 Recherche de la toxine déoxynivalénol (DON) au niveau du substrat.....	120
III.2 Seconde partie : Biocontrôle de <i>Fusarium graminearum</i>	123
III.2.1 Résultats des interactions entre les espèces fongiques.....	123
III.2.1.1 Confrontation par contact direct.....	123
III.2.1.2 Confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h- Agent pathogène).....	125
III.2.1.3 Confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène-72h- Agent antagoniste).....	128
III.2.1.4 Confrontation par contact direct à distance d'espace.....	130
III.2.2 Activité antifongique des bactéries lactiques.....	134
III.2.2.1 Isolement et caractérisation morphologique.....	134
III.2.2.2 Caractérisation physiologique	134
III.2.2.3 Caractérisation biochimique.....	134
III.2.2.4 Caractérisation d'intérêt sanitaire	139
III.2.2.5 Caractérisation technologique et enzymatique.....	139

III.2.2.6 Résultats de l'activité antifongique des bactéries lactiques.....	147
III.2.2.7 Résultats de l'activité anti-DON.....	153

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE

Discussion générale.....	155
Conclusion et perspectives.....	166
Références bibliographiques.....	170
Annexes.....	200

LISTE DES ABREVIATIONS

A: *Aspergillus*
A/AI: *Alternaria*
ADN: Acide Deoxyribonucléique
ADNr: Acide Deoxyribonucléique ribosomique
ADON : Acetyl-déoxynivalénol
AFB1: Aflatoxine B1
AFB2: Aflatoxine B2
Afl : *Aspergillus flavus*
Ang : *Aspergillus niger*
Apr : *Aspergillus parasiticus*
A_w : Activité de l'eau
B : *Bifidobacterium*
BDF : Blé Dur Français
BDL : Blé Dur Local
BHI : Brain Heart Infusion
BTF : Blé Tendre Français
BTL : Blé Tendre Local
C: *Cladosporium*
CATC: Citrate Azide Tween Carbonate
Ccl : *Cladosporium cladosporoides*
CCLS : Cooperative des céréales et des légumes secs
CCM : Chromatographie sur couche mince
Chb : *Cladosporium herbarum*
Citr: citrate
CYA: Czapek Yeast Agar
DCMA: Dichloran Chloramphénicol Malt Extract Agar
DCPA : Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar
DON : Déoxynivalénol
E : Echantillon
E/Ent : *Enterococcus*
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPS: Exopolysaccharides
F: *Fusarium*
FB1: Fumonisine B1
FB2: Fumonisine B2
Fgr: *Fusarium graminearum*
FGSC: *Fusarium graminearum* species complex
FX: Fusarenone X
G: *Gibberella*

G25N: Glycerol (25%) Nitrate Agar
GCPSR: Genealogical Concordance Polygenetic Species Recognition
gMRS: GYEP-MRS: Glucose Yeast Extract Peptone-Man Rogosa et Sharpe (1:1, v:v)
GYEP: Glucose Yeast Extract Peptone
HIV: Human Immunodeficiency Virus
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HR : Humidité relative
IgA : Immunoglobuline classe A
L : *Lactococcus*
LAB : Lactic Acid Bacteria (Bactérie lactique)
Lb/Lact : *Lactobacillus*
Leuc/Ln : *Leuconostoc*
MA : Malt Agar (gélose au malt)
MEA: Malt Extract Agar
MG : Matière grasse
MRS : Man Rogosa et Sharpe
MSE : Mayeux, Sandine et Elliker
NIV : Nivalénol
P: *Penicillium*
P/Ped: *Pediococcus*
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDA: Potato Dextrose Agar
Pjt: *Penicillium janthinellum*
PLA: Phényllactique
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RLFP: Restriction Length Fragment Polymorphism Sequences
SNA: Synthetischer Nährstoffarmer Agar
St: *Streptococcus*
T : *Trichoderma*
TCTB : Trichothécène type B
UFC : Unité Formant Colonie
Var : Variété
W: *Weissella*
YMA: Yeast Milk Agar

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1 : Les différentes sections et espèces des <i>Fusaria</i> selon les principaux systèmes taxonomiques.....	8
Tableau I.2 : Exemples des <i>Fusarium</i> producteurs de mycotoxines.....	12
Tableau I.3 : Effet antifongique et anti-mycotoxique de quelques bactéries lactiques et de leur composé actif.....	34

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau II.1 : Données informatives sur les échantillons des blés	40
--	----

CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRÉTATIONS

Tableau III.1 : Résultats de la caractérisation chimique des blés durs locaux	64
Tableau III.2 : Résultats de la caractérisation chimique des blés durs importés.....	65
Tableau III.3 : Résultats de la caractérisation chimique des blés tendres locaux	65
Tableau III.4 : Résultats de la caractérisation chimique des blés tendres importés...	66
Tableau III.5 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé dur local et importé sur milieu PDA.....	68
Tableau III.6 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé dur local et importé sur milieu DCPA.....	69
Tableau III.7 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé tendre local et importé sur milieu PDA.....	70
Tableau III.8 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé tendre local et importé sur milieu DCPA	71
Tableau III.9 : Quantité en déoxynivalénol dans le blé tendre local et importé.....	121
Tableau III.10 : Quantité en déoxynivalénol dans le blé dur local et importé.....	122
Tableau III.11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>F. graminearum</i>	133
Tableau III.12 : Résultats de l'API 50 CHL.....	135
Tableau III.13 : Résultats morphologiques, physiologiques et biochimiques des dix-neuf isolats lactiques.....	136
Tableau III.14 : Résultats des activités amylolytique, lipolytique et protéolytique...	145
Tableau III.15 : Résultats du pouvoir épaississant et coagulant des bactéries lactiques sélectionnées.....	146
Tableau III.16 : Pouvoir autolytique des souches lactiques.....	147

Tableau III.17 : Nature des métabolites extracellulaires produits par les bactéries lactiques.....	152
---	-----

ANNEXES

Tableau 1 : Les différents critères de la qualité du blé tendre et du blé dur à l'échelle national (Journal officiel de la république algérienne, décret n°88-152 du 26 juillet 1988).....	203
Tableau 2 : les différents critères de la qualité du blé tendre et du blé dur à l'échelle mondiale (Codex STAN 199-1995).....	203

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1 : Les principaux systèmes taxinomiques des <i>Fusaria</i>	7
Figure I.2 : Cycle biologique des <i>Fusarium</i> sur céréale	10
Figure I.3 : Macroconidies.....	13
Figure I.4 : Différents types de microconidies des espèces fusariennes.....	14
Figure I.5 : Différents types et dispositions des chlamydospores.....	14
Figure I.6 : Caractéristiques des spores de quelques espèces de <i>Fusarium</i>	16
Figure I.7 : Différentes lignées de <i>Gibberella zeae</i>	17
Figure I.8 : Localisation et migration géographique des différentes lignées de <i>Gibberella zeae</i>	18
Figure I.9 : Arbre phylogénétique représentant les 15 espèces du complexe FGSC.....	19
Figure I.10 : Vue microscopique de <i>F. graminearum</i>	21
Figure I.11 : Structure chimique des trichothécènes du groupe B.....	22
Figure I.12 : Structure chimique générale du déoxynivalénol.....	23
Figure I.13 : Voie de biosynthèse des trichothécènes.....	23
Figure I.14 : Différents modes d'interaction entre deux espèces fongiques sur milieu gélosé.....	29
Figure I.15 : Diagramme représentatif des relations plante hôte-agent pathogène-agent antagoniste.....	30

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Figure II.1 : Mode d'inoculation des milieux de culture par les différents isolats fongiques	44
Figure II.2 : Confrontation par contact direct sur milieu de culture gélosé	49
Figure II.3 : Confrontation par contact direct à distance de temps	50
Figure II.4 : Confrontation par contact direct à distance d'espace	50

CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Figure III.1 : <i>Alternaria alternata</i>	72
Figure III.2 : <i>Alternaria infectoria</i>	73
Figure III.3 : <i>Aspergillus clavatus</i>	74
Figure III.4 : <i>Aspergillus fischerianus</i>	75
Figure III.5 : <i>Aspergillus flavus</i>	76

Figure III.6: <i>Aspergillus fumigatus</i>	77
Figure III.7 : <i>Aspergillus japonicus</i>	78
Figure III.8 : <i>Aspergillus nidulans</i>	79
Figure III.9 : <i>Aspergillus niger</i>	80
Figure III.10 : <i>Aspergillus niveus</i>	81
Figure III.11 : <i>Aspergillus oryzae</i>	82
Figure III.12 : <i>Aspergillus parasiticus</i>	83
Figure III.13 : <i>Aspergillus sydowii</i>	84
Figure III.14 : <i>Aspergillus terreus</i> (Aspect 1).....	85
Figure III.15 : <i>Aspergillus terreus</i> (Aspect 2).....	86
Figure III.16 : <i>Aspergillus ustus</i>	87
Figure III.17 : <i>Cladosporium cladosporioides</i>	88
Figure III.18 : <i>Cladosporium herbarum</i>	89
Figure III.19 : <i>Fusarium equiseti</i> var. <i>compactum</i>	90
Figure III.20 : <i>Fusarium graminearum</i>	91
Figure III.21 : <i>Fusarium oxysporum</i>	93
Figure III.22 : <i>Fusarium poae</i>	94
Figure III.23 : <i>Fusarium solani</i>	95
Figure III.24 : <i>Fusarium subglutinans</i>	96
Figure III.25 : <i>Fusarium verticillioides</i>	97
Figure III.26 : <i>Penicillium chrysogenum</i>	98
Figure III.27 : <i>Penicillium citreonigrum</i>	99
Figure III.28 : <i>Penicillium digitatum</i>	100
Figure III.29 : <i>Penicillium expansum</i>	101
Figure III.30 : <i>Penicillium fellutanum</i>	102
Figure III.31 : <i>Penicillium funiculosum</i>	103
Figure III.32 : <i>Penicillium glabrum</i>	104
Figure III.33 : <i>Penicillium glandicola</i>	105
Figure III.34 : <i>Penicillium italicum</i>	106
Figure III.35 : <i>Penicillium janthinellum</i>	107
Figure III.36 : <i>Penicillium oxalicum</i>	108
Figure III.37 : <i>Penicillium paxilli</i>	109
Figure III.38 : <i>Penicillium pinophilum</i>	110
Figure III.39 : <i>Penicillium simplicissimum</i>	111
Figure III.40 : <i>Penicillium thomii</i>	112
Figure III.41 : <i>Penicillium variable</i>	113
Figure III.42 : <i>Ulocladium botrytis</i>	114
Figure III.43 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de <i>F. graminearum</i> à différentes températures.....	116
Figure III.44 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de <i>F. graminearum</i> à différents pH.....	117
Figure III.45 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de <i>F. graminearum</i> à différentes A _w	118

Figure III.46 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de <i>F. graminearum</i> à différentes concentrations en NaCl.....	119
Figure III.47 : Plaque CCM des Isolats de <i>F. graminearum</i> à chimotype DON.....	120
Figure III.48 : Plaque CCM pour le dosage du DON à partir du substrat.....	120
Figure III.49 : Résultats du test ELISA (Celer DON V3 de marque tecnalab).....	122
Figure III.50 : Confrontation directe entre <i>F. graminearum</i> et <i>Aspergillus sp.</i>	123
Figure III.51 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct entre <i>Aspergillus sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	124
Figure III.52 : Confrontation directe entre <i>F. graminearum</i> et <i>Cladosporium sp.</i>	124
Figure III.53 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct entre <i>Cladosporium sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	124
Figure III.54 : Confrontation directe entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	125
Figure III.55 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct entre <i>P. janthinellum.</i> et <i>F. graminearum</i>	125
Figure III.56 : Confrontation directe à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre <i>F. graminearum</i> et <i>Aspergillus sp.</i>	126
Figure III.57 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre <i>Aspergillus sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	126
Figure III.58 : Confrontation directe à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre <i>F. graminearum</i> et <i>Cladosporium sp.</i>	127
Figure III.59 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre <i>Cladosporium sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	127
Figure III.60 : Confrontation directe à distance de temps (Agent antagoniste-72h- Agent pathogène) entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	127
Figure III.61 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	128
Figure III.62 : Confrontation directe à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre <i>F. graminearum</i> et <i>Aspergillus sp.</i>	128
Figure III.63 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène -72h-Agent antagoniste) entre <i>Aspergillus sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	129
Figure III.64 : Confrontation directe à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre <i>F. graminearum</i> et <i>Cladosporium sp.</i>	129
Figure III.65 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre <i>Cladosporium sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	129
Figure III.66 : Confrontation directe à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	130

Figure III.67 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène -72h-Agent antagoniste) entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	130
Figure III.68 : Confrontation directe à distance d'espace entre <i>F. graminearum</i> et <i>Aspergillus sp</i>	131
Figure III.69 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance d'espace entre <i>Aspergillus sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	131
Figure III.70 : Confrontation directe à distance d'espace entre <i>F. graminearum</i> et <i>Cladosporium sp</i>	132
Figure III.71 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance d'espace entre <i>Cladosporium sp.</i> et <i>F. graminearum</i>	132
Figure III.72 : Confrontation directe à distance d'espace entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	132
Figure III.73 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct à distance d'espace entre <i>F. graminearum</i> et <i>P. janthinellum</i>	133
Figure III.74 : Progression de l'acidité Dornic et du pH en fonction de la cinétique de croissance des différentes souches lactiques.....	140
Figure III.75 : Résultats du test qualitatif de l'effet anti-F.gr des bactéries lactiques sélectionnées.....	148
Figure III.76 : Distribution des bactéries lactiques testées en fonction de leur taux d'inhibition anti-F.gr.....	149
Figure III.77 : Effet de l'interaction entre les bactéries lactiques et les souches de <i>F. graminearum</i> sur le taux d'inhibition.....	149
Figure III.78 : Résultats du test quantitatif de l'effet anti-F.gr des bactéries lactiques sélectionnées.....	150
Figure III.79 : Distribution des bactéries lactiques testées en fonction du taux d'inhibition anti- <i>F.gr</i> de leur métabolite extracellulaire.....	150
Figure III.80 : Effet de l'interaction entre les métabolites extracellulaire des bactéries lactiques et les souches de <i>F. graminearum</i> sur le taux d'inhibition.....	151
Figure III.81 : Plaques CCM de la nature des métabolites extracellulaires des LAB.....	152
Figure III.82 : Plaque CCM de DON produit par <i>F. graminearum</i> en présence des LAB.....	153

ANNEXES

Figure 1 : Prévalence des mycotoxines dans le monde entre 2005 et 2012.....	200
Figure 2 : Témoins de <i>F. graminearum</i> . (A) techniques 1, 2 et 3 ; (B, C) technique 4.....	203

Introduction

INTRODUCTION

L'Algérie, de par les coutumes et les habitudes alimentaires de sa population, est considérée comme étant un pays consommateur de céréales par excellence. Parmi ces céréales, le blé est le plus consommé, que ce soit sous sa forme brute ou transformée en couscous, pâtes, pains, *Frik* etc. (Riba et al., 2010). Bien que l'Etat algérien réserve en moyenne, plus d'un million et demi d'hectares pour la culture de blé depuis 1961, l'Algérie reste dépendante des importations, principalement, de France. Cette contrainte de se tourner vers le marché extérieur s'explique par une forte demande du marché national et par une faible production locale. La quantité massive importée et le stockage à long terme favorisent la contamination fongique causant, par ce fait, la perte de la qualité du grain et de sa salubrité. Chaque année, les céréales sont contaminées par les moisissures et leurs toxines dans la plupart des pays du monde avec une fréquence et un niveau de concentration variables ; ceci, en fonction des facteurs climatiques (Saint-Cyr, 2013). En effet, les mycotoxines retiennent l'attention dans le monde entier en raison des pertes économiques importantes qu'elles font subir, surtout celles relatives aux grains en stockage, à leurs effets sur la santé de l'homme et de l'animal et à leurs retombées négatives sur le commerce national et international. Deux types de toxines existent : celles qui sont produites pendant le stockage des grains et celles qui sont produites pendant la croissance des grains au champ (avant la récolte). Le déoxynivalénol qui va être étudié dans le présent travail de thèse, fait partie de ce dernier groupe (Bottalico, 1998).

Le déoxynivalénol ou la vomitoxine appartient à la famille des trichothécènes type B (Malachova et al., 2015 ; Chilaka et al., 2018 ; James et Zikankuba, 2018). Il peut causer divers effets toxiques sur la santé humaine et animale, notamment l'infertilité, effet mutagène et cancérigène (Nelson et al., 1991 ; Thiel et al., 1991 ; Shephard et al., 2005), les diarrhées, vomissements, leukopénie et hémorragie (Foroud et Eudes, 2009), et également l'hématotoxicité et la toxicité cutanée (Robbana-Barnat et al., 1989). Cette toxine qui est la plus fréquemment retrouvée dans les céréales, est une fusariotoxine biosynthétisée par *Fusarium graminearum* et *F. culmorum*.

F. graminearum Schwab est considéré comme étant le principal agent de la fusariose des céréales dans le monde entier (Hornok, 2007 ; Yli-Mattila et al., 2009). De plus, cette espèce est, selon plusieurs auteurs, la plus fréquemment rencontrée notamment aux USA et au Canada, en Australie, en Europe et en Chine (Chen et al., 1982 ; Burgess et al., 1987 ; Gilbert et Tekauz, 2000 ; Tan et Niessen, 2003). En France, *F. graminearum* Chemotype DON est l'espèce la plus communément retrouvée sur les grains de blé causant annuellement des pertes économiques et sanitaires dramatiques (Chehri et al., 2011 ; Korn et al., 2011 ; Orlando et al., 2019). De plus, cet agent pathogène et DON peuvent persister sur les grains durant de longues années de stockage (Zhang et al., 2007).

Selon **Champeil (2004)**, aucune production végétale n'échappe *à priori* aux risques des contaminations fongiques à l'étape de culture (nous nous intéressons ici aux céréales) : risques provenant du sol et des parcelles avoisinantes et/ou des risques liés à l'exposition aux mycotoxines (**Doré et al., 2002**). En Algérie, seules les aflatoxines et les ochratoxines A ont fait l'objet de larges études (**Khalef et al., 1993 ; Riba et al., 2008, 2010**). *A contrario*, nous enregistrons peu d'études sur la fréquence de contamination de *F. graminearum* Chemotype DON sur les blés consommés à l'échelle nationale ou encore sur les quantités en DON pouvant être quantifiées.

La présente thèse s'inscrit dans une première perspective : d'une part en **l'identification des espèces fongiques toxigènes tout en focalisant notre recherche sur *F. graminearum* Chemotype DON**, et d'autre part, en la **recherche et la quantification du déoxynivalenol dans les blés consommés à Béchar, par CCM et ELISA quantitative**.

Par ailleurs, une espèce fongique vit et se développe, à l'instar des autres êtres vivants, dans un environnement complexe où elle est dépendante de plusieurs facteurs abiotiques (température, humidité, pH, etc.) et biotiques (moisissures, bactéries, levures, etc.). En effet, il est connu que le climat est le principal facteur affectant le développement des *Fusarium* sur le grain (**Langseth et al., 1995**). L'humidité détermine la sévérité et l'intensité de la contamination ; les précipitations et les radiations, quant à elles, déterminent le nombre de spores par épi (**Francel, 1998**). En résumé, le climat joue un rôle dans toutes les étapes du développement du champignon (**Andersen, 1948 ; Bai et al., 2001**). De plus, il contrôle la compétition entre les différentes espèces fongiques et les différents genres, ceci par le contrôle du taux de la croissance mycélienne de chaque souche (**Andersen, 1948 ; Champeil et al., 2004**) et de la quantité de la toxine produite (**Sutton, 1982 ; Chelkowski et al., 2000 ; Hooker et al., 2002**).

Notre travail de thèse s'inscrit, également, dans cette deuxième perspective : **en l'étude de l'effet des principaux facteurs de l'environnement, notamment la température, le pH, l' A_w et le NaCl, mais aussi, la présence des autres espèces fongiques autochtones des mêmes biotopes, sur le développement de *F. graminearum* Chemotype DON**.

Eu égard aux risques qu'encourt la population locale et nationale quant à la consommation des grains de blés insalubres, nous nous sommes proposés d'essayer de trouver une solution de lutte biologique vis-à-vis de *F. graminearum* Chemotype DON et de la synthèse du DON. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur les bactéries lactiques abritant les mêmes échantillons que le pathogène. Le choix de ces microorganismes est dû à leur statut GRAS (Generally Regarded As Safe) et à leur potentiel probiotique. Ces deux particularités les promettent à être candidats potentiels pour le biocontrôle des moisissures. Les bactéries lactiques sont capables de s'adapter à divers environnements extrêmes (**Romeo et al., 2001**).

La dernière perspective de la présente thèse est : **l'étude de l'effet anti-*F. graminearum* et anti-DON des bactéries lactiques autochtones des grains de blé tout en spécifiant la nature des métabolites extracellulaires de ces bactéries**. Néanmoins, une caractérisation morphologique, sanitaire, biochimique et technologique de ces bactéries lactiques est jugée nécessaire et complémentaire.

Le présent travail a pour objet d'étude les blés tendres et durs consommés par la population béchari. Ce travail, à la croisée des enjeux de la sécurité sanitaire des aliments et ceux de la lutte biologique, a pour objectif la contribution à la connaissance et à l'identification du patrimoine fongique des grains de blé à Béchar d'une part, et d'autre part, à trouver des solutions saines permettant de lutter contre les moisissures et leurs toxines associées.

Trois hypothèses ont été proposées :

- 1. Hypothèse 1 : la croissance mycélienne dépend des facteurs de l'environnement ce qui influence la variabilité des espèces fongiques des blés.**
- 2. Hypothèse 2 : les interactions fongiques pour le même substrat, influencent le développement d'une espèce fongique par rapport à une autre, tout en ayant un effet corrélatif positif, plutôt négatif, ou encore neutre.**
- 3. Hypothèse 3 : les grains de blé abritent des microorganismes sains, notamment des bactéries lactiques, capables de limiter, voire éliminer les moisissures et leurs toxines associées.**

Le premier chapitre de ce manuscrit est réservé à une synthèse bibliographique qui se présente en une chronologie logique des connaissances, tant en ce qui concerne la contamination fongique des blés, notamment par les espèces fusariennes (principalement *F. graminearum*), leurs effets sur la santé publique et sur les cultures que sur le déoxynivalenol : sa nature, ses effets néfastes et les moyens de luttés conventionnelles utilisées. Il est également, exposé sous forme d'une synthèse, les résultats des travaux publiés récemment et auparavant sur les interactions fongiques et l'effet antifongiques et anti-mycotoxique des bactéries lactiques.

Le deuxième chapitre expose les objectifs de la thèse, le matériel utilisé pour la réalisation des différentes analyses et détaille la méthodologie de recherche et la démarche expérimentale mise en place afin de répondre aux hypothèses émises.

Dans un troisième chapitre, nous présentons les différents résultats obtenus au cours de notre travail de recherche tout en les interprétant. Il sera représenté en deux parties distinguées : la première partie rapporte les résultats de l'identification et de la caractérisation morphologiques, toxicologiques et physiologiques des moisissures des blés ; et la seconde partie traite les résultats du biocontrôle des espèces de *F. graminearum*, ceci en deux

temps : étude des interactions fongiques et la prospection sur les bactéries lactiques à effets anti- *F. graminearum* et anti-DON.

A la discussion des résultats obtenus, nous avons réservé le quatrième chapitre.

Et enfin, nous terminons le présent travail par une conclusion et des recommandations.

Chapitre I :

Synthèse Bibliographique

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le genre *Fusarium* a été décrit véritablement pour la première fois en **1809** par **Link**. Il inclue des champignons imparfaits ou anamorphes appartenant à la division des *Deutéromycètes*, à la classe des *Hyphomycètes*, à l'ordre des *Tuberculariales* et à la famille des *Tuberculariaceae*, seule famille du présent ordre (**Nelson et al., 1983 ; Jeunot, 2005**). Ces espèces ont une reproduction asexuée qui se fait par le biais de conidies de formes et d'organisation très variées, et reconnues comme un aspect de classification (**Siou 2013**). D'autres sont parfaits ou téléomorphes dont leur reproduction est sexuée. Ils appartiennent à la division des *Ascomycètes*, à la sous division des *Ascomycotina*, à l'ordre des *Hyphocreales*, à la famille des *Nectriaceae* et aux genres *Gibberella*, *Calonectria*, *Nectria* (**Nelson et al., 1983 ; McGee, 1992**) et *Plectosphaerella* (**Pitt et Hocking, 2009**). Pour plusieurs espèces fusariennes, le stade parfait n'est pas connu. Le genre *Fusarium* comprend entre 40 et 70 espèces, souvent, largement répandues.

La taxonomie du présent genre, a fait l'objet de plusieurs essais de classification au cours du précédent siècle (**Nelson et al., 1994 ; Jeunot, 2005 ; Mercedes, 2012**), d'où diverses clés d'identification ont été établies, en commençant par celle de **Wollenweber et Reiking** en **1935** jusqu'à celle de **Nelson, Toussoun et Marasas** en **1983**. La **figure I.1** et le **tableau I.1** résumeront les principaux systèmes de classification, les différentes sections et espèces des *Fusaria*. A l'heure actuelle nous utilisons, principalement, une classification dérivée de celle de **Nelson et al. (1983)** qui regroupe les espèces fusariennes en 15 sections. Ce classement a été amendé par **Burgess et al.** en **1994**, puis par d'autres chercheurs grâce à l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire (**Leslie et Summerell, 2006 ; Mercedes, 2012**).

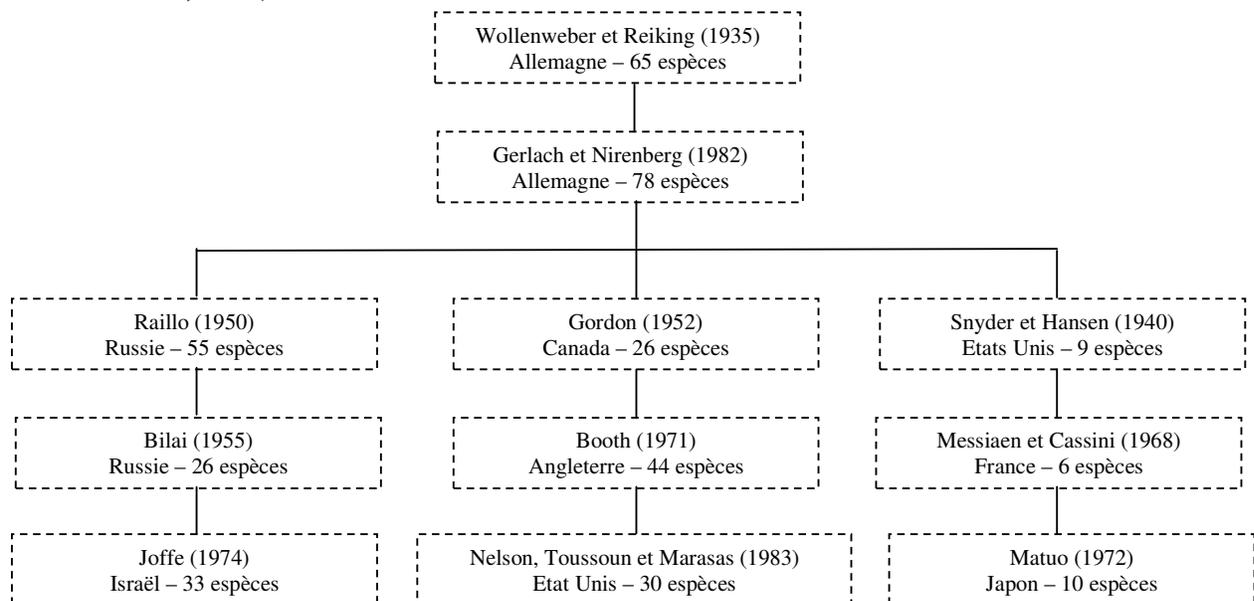


Figure I.1 : Les principaux systèmes taxinomiques des *Fusaria* (**Nelson, 1991 ; Jeunot, 2005 ; Leslie et Summerell, 2006**).

Tableau I.1 : Les différentes sections et espèces des *Fusaria* selon les principaux systèmes taxonomiques (Jeunot, 2005)

Section de Wollenweber et Reiking (1935)	Espèces de Snyder et Hansen (1940)	Espèces de Messiaen et Cassini (1968)	Système de Nelson et al. (1983)	
			Sections	Espèces
<i>Submicrocera</i>				
<i>Pseudomicrocera</i>				
<i>Macroconia</i>	<i>F. epispaeria</i>	<i>F. epispaeria</i> var <i>gigas</i>		
<i>Eupionnotes</i>		<i>F. epispaeria</i> <i>F. epispaeria</i> var <i>dimerum</i>	<i>Eupionnotes</i>	<i>F. aquaeductuum</i> <i>F. merismoides</i> <i>F. dimerum</i>
<i>Spicarioides</i>	<i>F. rigidiscula</i>	<i>F. rigidisculum</i>	<i>Spicarioides</i>	<i>F. decemcellular</i>
<i>Arachnites</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. nivale</i>	<i>Arachnites</i>	<i>F. nivale</i> ► <i>M. nivale</i>
<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. tricinctum</i> <i>F. poae</i> <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. chlamydosporum</i>
<i>Roseum</i>	<i>F. roseum</i>	<i>F. roseum</i> var <i>avenaceum</i> <i>F. roseum</i> var <i>arthrosporioides</i>	<i>Roseum</i>	<i>F. avenaceum</i> (dont <i>F. arthrosporioides</i>) <i>F. graminum</i>
<i>Arthrosporiella</i>			<i>Arthrosporiella</i>	<i>F. semitectum</i> <i>F. camptoceras</i>
<i>Gibbosum</i>		<i>F. roseum</i> var <i>gibbosum</i>	<i>Gibbosum</i>	<i>F. equiseti</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. longipes</i>
<i>Discolor</i>		<i>F. roseum</i> var <i>sambucinum</i> <i>F. roseum</i> var <i>graminearum</i> <i>F. roseum</i> var <i>culmorum</i>	<i>Discolor</i>	<i>F. heterosporum</i> <i>F. retuclatum</i> <i>F. sambucinum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>
<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i> <i>F. udum</i>
<i>Liseola</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. moniliforme</i> <i>F. moniliforme</i> var <i>subglutinans</i>	<i>Liseola</i>	<i>F. moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. anthophilum</i>
<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Martiella</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	<i>Marteilla</i>	<i>F. solani</i>
<i>Ventricosum</i>			<i>Ventricosum</i>	

Les *Fusarium* sont des phytopathogènes redoutables et fortement cellulolytiques qui s'implantent sur le grain avant la récolte (Breton, 1989 in Larpen, 1990 ; Godon et Loisel, 1997). Ces champignons contaminent plusieurs cultures, notamment, les céréales, les arbres fruitiers et les cultures maraîchères en provoquant, ainsi, des maladies nommées « fusarioses » (Imathiu et al., 2014). En effet, ils causent, généralement, la pourriture des racines, des tiges et des fruits, la dégradation du système vasculaire (Trenholm et al.,

1988 ; Belyagoubi, 2006), des pertes en rendement (diminution du poids de 1000 grains, réduction du nombre de grains par épis et du poids des épis), et altèrent la qualité organoleptique et sanitaire des grains (**Leplat, 2012**). C'est une maladie très répandue dans le monde entier, principalement en zones humides (**Schachermayr et Fried, 2000**). La fusariose comme son nom l'indique est, donc, une maladie causée par les espèces du genre *Fusarium* principalement *Fusarium avenaceum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, et d'autres qualifiées d'espèces secondaires car elles s'avèrent moins pathogènes ; il s'agit de *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. arthrosporioides*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* (**Jeunot, 2005 ; Xu et Nicholson, 2009 ; Kermiche, 2013**).

La fusariose de l'épi a été décrite pour la première fois par **W.G. Smith** en **1884** qui l'a nommé « *Gale du blé* » ou « *Wheat scab* » terme modifié en **1920** par **Atanasoff** en « *maladie de Fusarium* » ou « *Fusarium blight* », puis par **Douin** en **1926** en « *fusariose* » (**Siou, 2013**). Cette maladie a la capacité de détruire une récolte potentiellement à haut rendement à quelques semaines de la récolte. Elle a été considérée comme une menace majeure pour le blé et l'orge au début du XX^e siècle. La fusariose a augmenté dans le monde et les flambées récentes ont été signalées en Asie, au Canada, en Europe et en Amérique du Sud. Aux États-Unis, la fusariose a atteint des niveaux épidémiques durant plusieurs années au cours de la dernière décennie, causant des pertes en rendement et des réductions de prix résultant de la diminution de la qualité des semences (**Turkington et al., 2016**).

Les *Fusarium* survivent habituellement comme des saprophytes sur les débris végétaux et/ou dans le sol sous forme de spores en latence (chlamydospores). Pendant la nouvelle saison de la végétation des céréales et lorsque les conditions deviennent favorables, ces spores atteignent les épis et causent l'infection de ces derniers (**Parry et al., 1995 ; Louzon et Rioeux, 2007**). La période critique pour l'infection des épis débute au stade de l'épiaison pour s'étendre en quelques jours. Notons que la pluie et l'humidité associées à la chaleur jouent un rôle très important et ont un impact sur le taux et la sévérité de l'infection (**Jeunot, 2005**). En effet, les chlamydospores et/ou les ascospores sont principalement dispersées par temps de pluie et entraînées par le vent ou par les insectes dans les pays chauds, sur les plantes de céréales et leurs épis (**Horberg, 2002 ; Bouneghou, 2010**). Généralement, les ascospores semblent être les éléments contaminants les plus prolifiques dans la fusariose des épis, ce qui explique que la fusariose causée par *F. graminearum* Schwabe est la plus virulente parmi les fusarioses des épis. De plus, les insectes et/ou leurs larves causent des dommages sur l'enveloppe des grains et favorisent ainsi, la pénétration de l'*inoculum* à l'intérieur de la graine, ce qui prédispose celle-ci à une infection par des champignons avant que l'épi ne se forme (**Widstrom, 1992**). Une fois que les *inoculi* sont entraînées vers les épis et que les facteurs de l'environnement le permettent, nous assisterons à la propagation générale de la maladie.

L'infection chez le blé a lieu pendant une très courte période, principalement, au moment de la sortie des étamines, mais le risque d'infection est toutefois important et les conséquences de la maladie sont graves surtout sur le rendement en grains (**Louzon et**

Rioeux, 2007). Cependant, si l'infection se produit plus tard, lorsque les grains sont formés, le rendement en grains sera peu affecté, mais le niveau de toxines peut être élevé et le criblage ne permet pas d'éliminer les grains infectés tardivement. Dans ce sens, des études ont été réalisées depuis de longues années dans le but de connaître le site principal de la contamination des céréales par les *Fusarium*.

Arthur en **1891** était le premier à affirmer que la fusariose des épis était une infection de la fleur en supposant que les spores disséminées par le vent se logent dans les parties internes des fleurs (**Jeunot, 2005**). Cette hypothèse fut confirmée plus tard en **1920** par **Atanasoff** qui inocula des épis de blé à divers stades de développements et démontra que la maladie était plus sévère quand l'inoculation se faisait durant le stade de la floraison. Cette hypothèse fut appuyée une année après par **Dickson** et son équipe qui affirmèrent que l'infection du blé par *F. avenaceum* et *F. culmorum* était plus sévère lorsque l'inoculation se faisait durant la floraison. Ils remarquèrent, également, que l'infection initiale se faisait *via* les anthères libres, ce qui laisse supposer que ces dernières sont le site initial de l'infection. D'autres études viennent confirmer cette hypothèse, il s'agit de celles réalisées par **Pugh et al.** en **1933**, par **Mackay et Loughmane** en **1945**, par **Andersen** en **1948**, par **Strange et Smith** en **1971** et plus tard par **Miller et al.** en **2004** qui ont observé que *F. graminearum* se développe d'abord sur les anthères et le pollen, progressent vers les ovaires, puis colonise la *lemma* et la *palea*. Cependant des chercheurs ont émis une seconde hypothèse à ce sujet et laissent supposer que le siège principal de l'infection sont les glumes et non pas les anthères ; mais cette hypothèse fut infirmée (**Jeunot, 2005**). La **figure I.2** illustre le cycle de développement des espèces fusariennes sur une céréale.

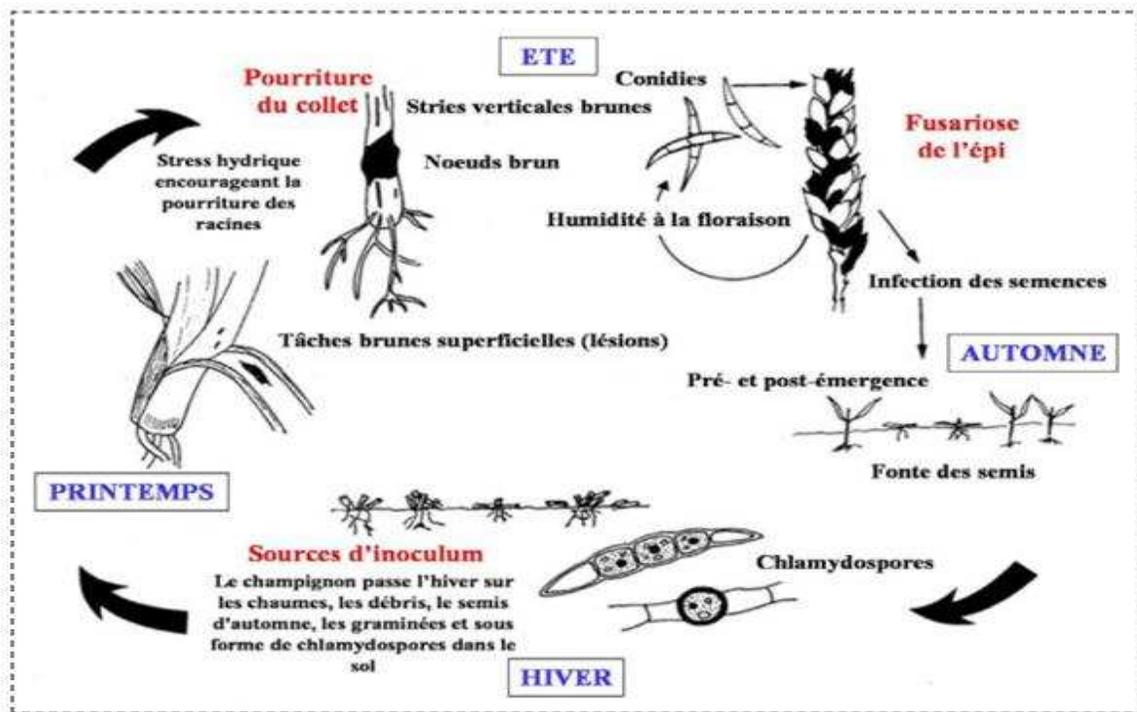


Figure I.2 : Cycle biologique des *Fusarium* sur céréale (**Parry et al., 1995**).

La fusariose peut se manifester durant tous les stades de la croissance d'une céréale et peut toucher tous ses organes : à la levée, dès ou durant la montaison, sur le col de l'épi, sur l'épi et sur les grains. Chez le blé, la sensibilité à la fusariose atteint un sommet pendant la floraison puis diminue à mesure que le grain mûrit (**Symons et al., 2002**). Les blés durs s'avèrent plus sensibles à la fusariose que les blés communs. Si elle survient tôt dans la saison, la fusariose provoque l'apparition de fleurs stérile et souvent des grains ratatinés de couleur blanc craie. Bon nombre de ces grains légers et ratatinés tombent au sol pendant la moisson, mais certains peuvent demeurer parmi les grains récoltés et sont alors appelés « *grains fusariés* » (**Symons et al., 2002**).

Les lésions causées par les *Fusarium* apparaissent souvent à la base de la tige, dans la gaine des feuilles que les racines coronales déchirent lors de leur sortie. Cette infection peut, ensuite, s'étendre à la gaine de la feuille : une propagation qui se manifeste par la présence de longues stries brunes à la base de la tige (**Andreas et al., 2008**). Le symptôme le plus fréquent est la coloration brune foncée des nœuds inférieurs. Sur les plants les plus anciens, l'infection peut générer un véritable pourridié, la base de la tige devient alors brune et pourrie, ce qui entraîne une verse et la formation d'épis argentés. Ce symptôme est moins fréquent même s'il peut être observé lors des périodes de grande sécheresse. Lorsque les épis sont infectés aux premiers stades de la floraison, nous constatons souvent un blanchiment de tout ou d'une partie de l'épi ce qui n'est pas observé quand l'infection est tardive (**Martin, 2004**). La phase de blanchiment des épis de cette maladie du blé peut provoquer une perte de rendement, mais la principale préoccupation est la production potentielle de mycotoxines dans les grains. La maladie se développe et se propage parfois très rapidement et peut affecter la totalité de l'épi et sa coloration devient rose à orange saumoné avec l'apparition de petits organes de fructification noirs produits par le champignon.

Mis à part les dommages causés aux récoltes et aux rendements, les *Fusarium* sont connus pour leur aptitude à synthétiser plusieurs types de toxines propres à chacune d'entre elles et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage et les hommes (**Tabuc, 2007 ; Xu et Nicholson, 2009 ; Siou, 2013**). Qualitativement et quantitativement, ces mycotoxines varient selon la souche fusarienne présente sur les plants (**Tableau I.2**). Les fusariotoxines peuvent être produites avant la récolte dans les épis et donc, être retrouvées dans les grains pendant le transport et le stockage des céréales (**Parry et al., 1995**). Elles diffusent dans le substrat qu'elles contaminent même après la destruction du champignon responsable de leur production. Peu labiles, elles sont souvent actives à très faibles doses, thermostables dans le temps et résistantes aux traitements biologiques et aux processus de transformation. Ainsi, une fois présentes dans le grain, elles persistent tout au long de la chaîne alimentaire (**Schaafsma et al., 2001**).

Tableau I.2 : Exemples des *Fusarium* producteurs de mycotoxines (Tabuc, 2007).

Espèces de <i>Fusarium</i>	Mycotoxines produites
<i>F. acuminatum</i>	Moniliformine, trichothécènes type A
<i>F. anthophilum</i>	Moniliformine
<i>F. avenaceum</i>	Fusarine C, moniliformines
<i>F. chlamydosporum</i>	Moniliformine
<i>F. cerealis</i> (sin. <i>crookwellense</i>)	Culmorine, fusarine C, trichothécènes type B
<i>F. culmorum</i>	Culmorine, fusarine C, trichothécènes type B, zéaralénone
<i>F. graminearum</i>	Trichothécènes type B, zéaralénone
<i>F. oxysporum</i>	Acide fusarique, moniliformines, oxysporine
<i>F. pallidoroseum</i> (sin. <i>semitectum</i>)	Moniliformine, zéaralénone
<i>F. poae</i> (sin. <i>tricinctum</i>)	Fusarine C, trichothécènes type A
<i>F. proliferatum</i>	Moniliformine
<i>F. sacchari</i>	Moniliformine
<i>F. sambucinum</i>	Fusarine C, trichothécènes type A
<i>F. solani</i>	Acide fusarique, naftoquinone
<i>F. sporotrichoides</i>	Fusarine C, trichothécènes type A, zéaralénone
<i>F. verticillioides</i> (sin. <i>moniliforme</i>)	Fumonisines, fusarine C, gibberelines, moniliformines, naftoquinone

Le pouvoir pathogène des espèces fusariennes chez l'homme et les animaux est varié. Certaines espèces sont à l'origine de kératites et d'endophtalmies ; d'autres espèces notamment, *F. solani* et *F. moniliforme* sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene, 1992). *F. verticillioides* peut être un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran et al., 1989). *F. oxysporum* est un agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hétopathie maligne (Thomas et Geraldine, 1992). *F. solani* est l'espèce la plus commune impliquée dans les fusarioses rencontrées chez les patients diabétiques et des ulcères cornéens (Del Palacio et al., 1985 ; Gari-Toussaint et al., 1997). En outre, ils ont un intérêt vétérinaire important par la production de zéaralénone qui est un anabolisant et un stimulant de la croissance animale associé à un effet contraceptif. Cependant et malgré tous ces risques pour la santé humaine, la production de métabolites par un organisme a un avantage probable pour lui car c'est une arme qu'il utilise pour survivre dans son environnement, tant pour se protéger contre les événements négatifs de cet environnement que pour assurer sa nutrition (Fox et Howlett, 2008).

La principale caractéristique morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies en forme fusiforme et cloisonnée, d'où le nom latin « *fusus* » qui signifie fuseau (Tabuc, 2007). Leur thalle est à croissance, habituellement, rapide et de couleur variée selon les espèces : blanc à crème, jaune brunâtre, rose, rouge, violet ou lilas (Jeunot, 2005 ; Pitt et Hocking, 2009). Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Botton et al., 1990 ; Chermette et Bussieras, 1993 ; Jeunot, 2005 ; Leslie et Summerell, 2006 ; Pitt et Hocking, 2009). Les conidiophores parfois très ramifiés forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores d'aspects gras. Les phialides sont plus ou moins allongées et peuvent produire deux types de conidies (Roquebert, 1998) :

- des macro-conidies fusiformes, souvent courbées, pluri-septées (3 à 7), à cloisons uniquement transversales, avec une cellule basale pédicellée formant une sorte de talon plus ou moins visible (**Figure I.3**) ; et/ou
- des micro-conidies (**Figure I.4**), généralement, septées (0 à 2), piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes ou encore en forme de rein (**Botton et al, 1990 ; Jeunot, 2005 ; Leslie et Sumerrell, 2006**) ; isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticilles ou plus rarement en chaînettes (*F. verticillioides*) ou encore en fausses têtes.

Quelques espèces fusariennes produisent les deux types de conidies et d'autres ne forment que des macro-conidies (**Botton et al, 1990 ; Jeunot, 2005**), ou principalement des micro-conidies. Les phialides, plus ou moins allongées présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (ex. *F. solani*) ou court et trapu (ex. *F. oxysporum*), ou présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides) comme c'est le cas de *F. proliferatum* (**Tabuc, 2007**). Les chlamydospores (**Figure I.5**), peuvent être présentes comme absentes, terminales comme intercalaires (**Roquebert, 1998**), et différenciées soit par le mycélium ou par les conidies (**Pitt et Hocking, 2009 ; Botton et al, 1990 ; Chermette et Bussieras, 1993 ; Jeunot, 2005**).

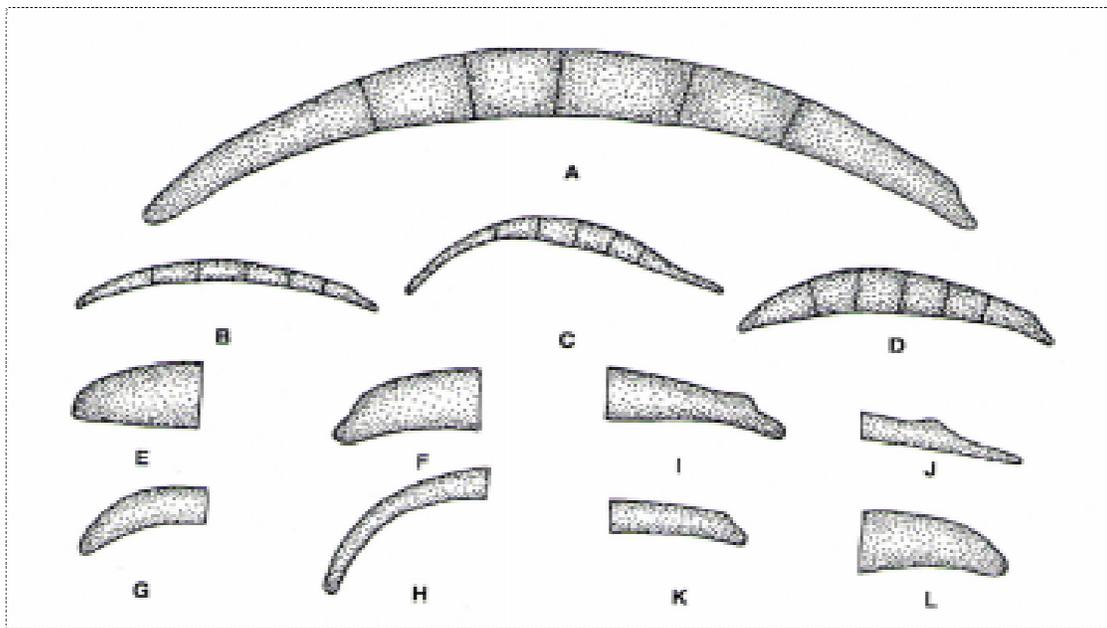


Figure I.3 : Macroconidies. (A, B, C, et D) représentent les différentes formes des macroconidies ; (E, F, G et H) différentes cellules apicales et (I, J, K et L) différentes cellules basales (**Leslie et Summerell, 2006**).

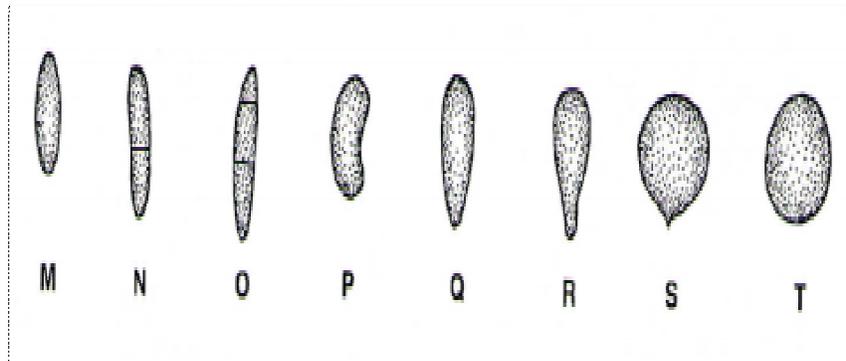


Figure I.4 : Différents types de micro-conidies des espèces fusariennes. (M) ovale ; (N) ovale à 2 cellules ; (O) ovale à 2 cellules ; (P) reniforme ; (Q) ovoïde avec une base tronquée ; (R) pyriforme ; (S) napiforme ; (T) globuleuse (Leslie et Summerell, 2006).

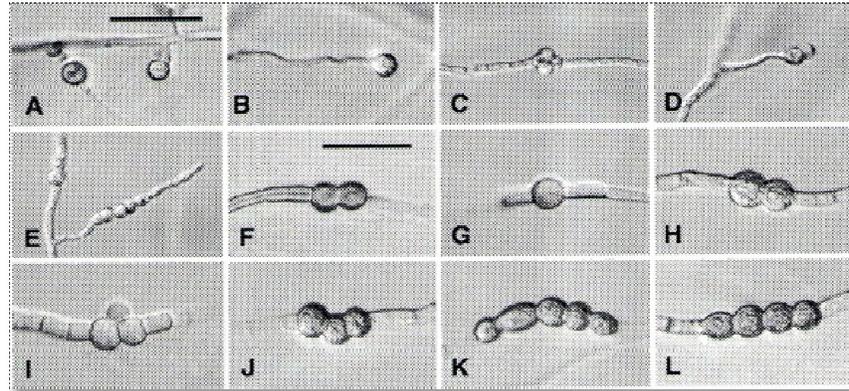


Figure I.5 : Différents types et dispositions des chlamydospores. (A-B) verruqueux et singuliers (*F. solani*) ; (C-D) cluster (*F. compactum*) ; (E) verruqueux en chaîne (*F. compactum*) ; (F) à paroi lisse en paire (*F. solani*) ; (G) singuliers et verruqueux (*F. scirpi*) ; (H) verruqueux en paire (*F. compactum*) ; (I) en cluster à paroi lisse (*F. scirpi*) ; (J-L) verruqueux en chaîne (*F. compactum*) ; (K) verruqueux en chaîne (*F. scirpi*) (Leslie et Summerell, 2006).

Au même titre que les autres genres fongiques, les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud (Chermette et Bussieras, 1993), mais se développent mieux sur gélose au malt (MA) et sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA). Pitt et Hocking (2009) affirment que d'autres milieux sont utilisés pour l'isolement et l'identification des *Fusaria*, en l'occurrence, le milieu Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar (DCPA) utilisé pour la première fois par Andrews et Pitt en 1986 pour isoler les espèces fusariennes à partir des grains et d'autres substrats. Ce milieu a été développé à partir du milieu Nash-Snyder (Nash et Snyder, 1962) utilisé pour l'énumération des *Fusarium* à partir du sol (Pitt et Hocking, 2009). Le milieu DCPA favorise la croissance et le développement des espèces fusariennes par rapport à d'autres espèces fongiques qualifiées d'avoir une vitesse de croissance importante comme les *Aspergillus* tout en réduisant le diamètre de leur colonie ce qui nous permettra d'avoir des colonies bien distinctes et aussi, inhiber la croissance de *Rhizopus* et

celle des *Mucor* à cause de l'association des deux antibiotiques : le dichloran et le chloramphénicol (**Leslie et Summerell, 2006 ; Pitt et Hocking, 2009**).

Le milieu Synthetischer Nährstoffärmer Agar (SNA) utilisé pour l'identification microscopique des différentes espèces fusariennes est un milieu pauvre en éléments nutritifs et permet une bonne fructification des conidies ce qui nous permettra d'observer les nappes de conidies, l'aspect des macros et des micro-conidies (cloisons, cellule basale et apicale, dimension etc.), l'abondance relative des micro-conidies dans le mycélium aérien, les chlamydospores etc. La **figure I.6** illustre l'aspect microscopique de quelques espèces fusariennes

La classification des champignons est historiquement basée sur de nombreux caractères morphologiques et biologiques observables. L'identification des champignons filamenteux est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères (**Guarro et al., 1999**). Dans le cas des *Fusarium*, l'examen des macro-conidies permet d'identifier rapidement le genre et en fonction de la forme et de la septation, donner une indication quant à l'espèce. Cependant, étant donné que ces microorganismes montrent rarement tous les aspects morphologiques nécessaires à leur identification, il est nécessaire de les cultiver. La culture des moisissures inconnues sur les différents milieux de culture sert à induire des phénotypes recherchés (**Hsu et al., 2003**). Outre le temps considérable de culture après l'isolement du champignon, de telles méthodes d'identification requièrent l'œil d'un expert pour les observations microscopiques ainsi qu'une expérience conséquente.

Des méthodes d'analyse biochimiques peuvent également apporter des informations sur le champignon. La détermination du contenu en acide gras, de la composition de la paroi cellulaire, de la composition en protéines ou encore des métabolites secondaires font partie des critères étudiés (**Hsu et al., 2003**).

Depuis des dizaines d'années, des méthodes d'identification basées sur des techniques de biologie moléculaire ont fait leurs preuves et se sont imposées par leur fiabilité. Ces techniques sont majoritairement basées sur l'ADN (**Del Mar Jimenez-Gasco et Jimenez-Diaz 2003**). L'amplification par PCR de régions spécifiques est une méthode puissante pour l'analyse ciblée d'un type de champignon. Le polymorphisme d'amplification d'ADN aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA ou RAPD) est une méthode basée sur l'amplification à l'aide d'amorces dégénérées des cibles aléatoires (**Hadrys et al., 1992**). Le profil de bandes obtenu peut être caractéristique et permet de distinguer une espèce fongique par rapport à une autre mais aussi les différentes souches de la même espèce.

Les méthodes basées sur l'analyse du polymorphisme de taille, de fragments, de restriction (Restriction Length Fragment Polymorphism [RFLP]) et la combinaison PCR et RFLP : analyse du polymorphisme de fragments amplifiés (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences : CAPS) sont, également, des méthodes robustes pour l'identification moléculaire des moisissures (**Kamiya et al., 2004**). Ces méthodes reposent sur des

séquences cibles spécifiques. Parmi les cibles classiquement utilisées pour l'identification, nous retrouvons l'ADN ribosomique (ADNr), l'ADN mitochondrial et parfois des séquences répétées de types microsatellites. Pour l'identification des champignons filamenteux, la cible prépondérante est l'ADNr (**Guarro et al., 1999**).

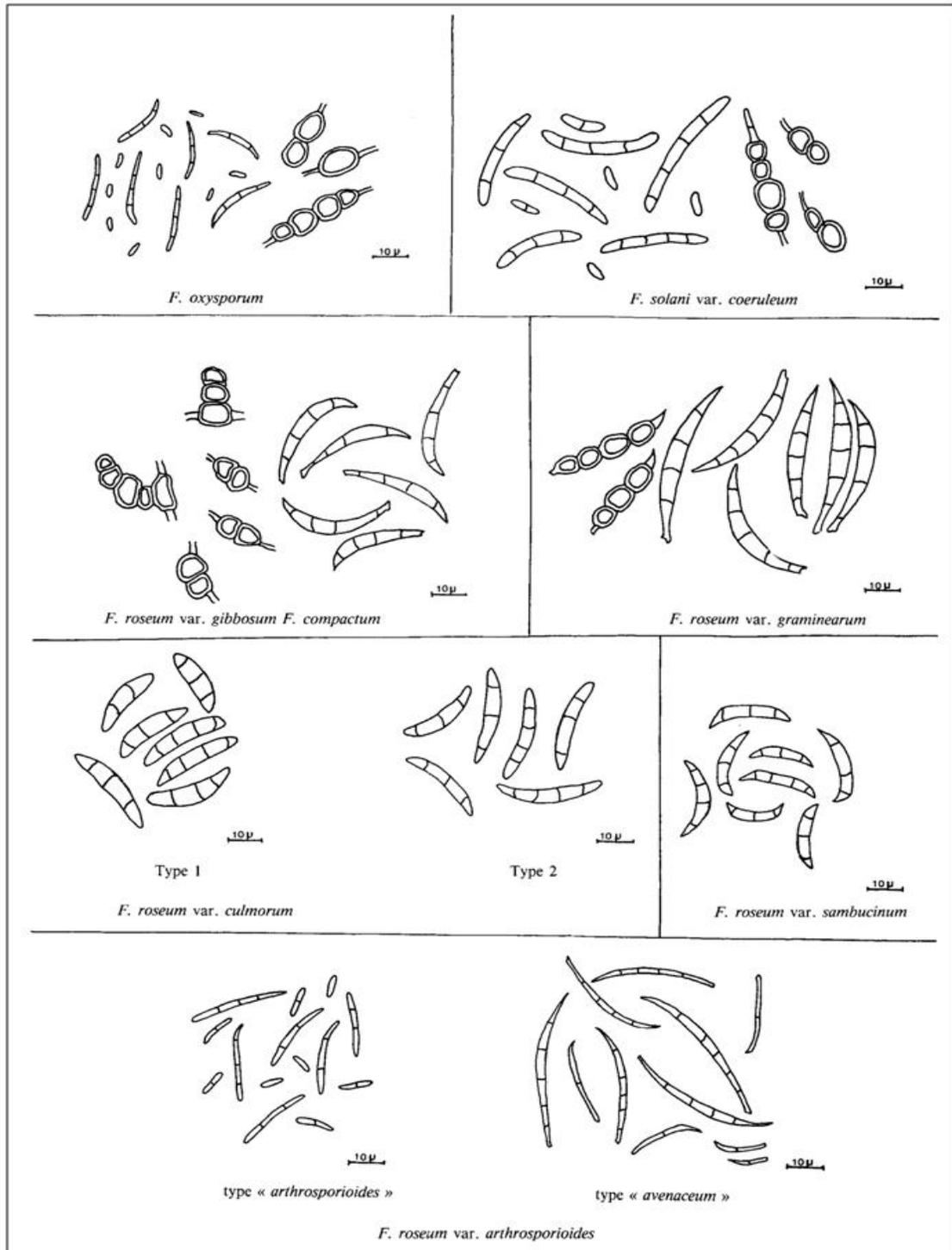


Figure I.6 : Caractéristiques des spores de quelques espèces de *Fusarium* (Tivoli, 1988)

D'autres techniques d'identification basées sur la détection de molécules ont, également, été développées. Elles visent les caractéristiques exo-antigènes qui caractérisent les champignons. Les techniques d'immuno-chimie et notamment la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ont couramment été utilisées dans ce but. Cette méthode de détection a, également, montré son efficacité dans la détection des champignons filamenteux (Li et al., 2000).

Parmi les espèces fusariennes les plus rencontrées et les plus redoutables, figure *Fusarium graminearum* Schwabe, objet principal du présent travail de thèse. *F. graminearum* est le nom de la forme anamorphe ou asexuelle et la forme téléomorphe ou sexuelle est *Gibberella zeae* (Turkington et al., 2016). Il est classé dans la famille des *Hypocreales mitosporiques*, dans l'ordre des *Hypocreales* (Desjardins, 2003), dans la division des *Ascomycètes*, classe des *Sordariaceae*, ordre des *Hypocréales*, et dans la famille des *Nectriaceae* (Lynch et al., 2003). Sept lignées phylogénétiques de *G. zeae* ont été mises en évidence (O'Donnell et al., 2000) d'après lesquelles, les auteurs ont établi un arbre phylogénétique à partir de la combinaison des données de 6 gènes (Figure I.7). Les origines des différentes lignées ainsi que leur migration sont représentées dans la figure I.8. L'Amérique du sud semble être le berceau de la plupart des lignées de *F. graminearum* (O'Donnell et al., 2000).

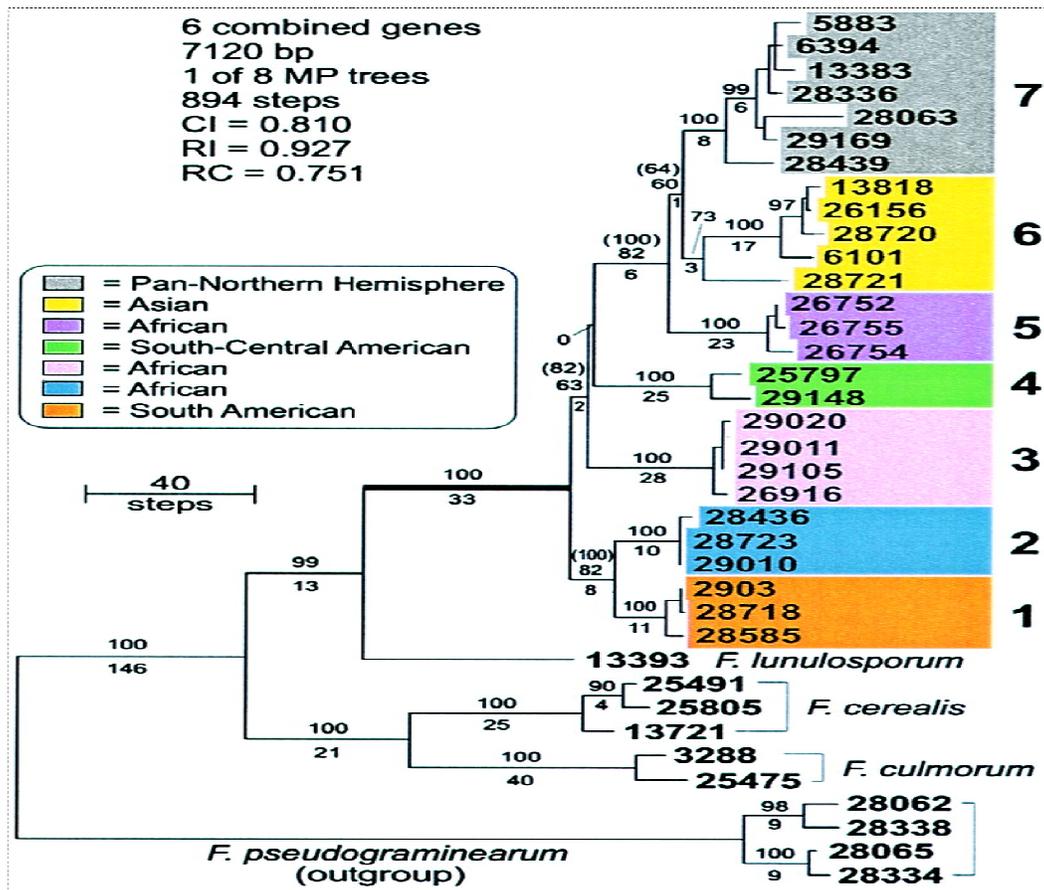


Figure I.7 : Différentes lignées de *Gibberella zeae* (O'Donnell et al., 2000).

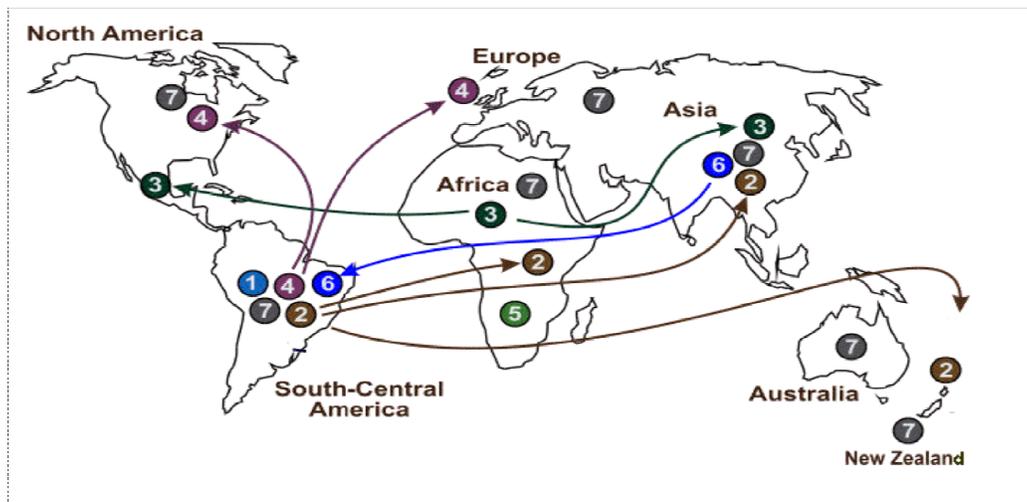


Figure I.8 : Localisation et migration géographique des différentes lignées de *Gibberella zeae* (O'Donnell et al., 2000).

F. graminearum est une espèce cosmopolite capable de contaminer, principalement, les graminées notamment le blé, le maïs et l'orge, mais également, la betterave sucrière, le soja, le sorgho, les bananes et la pomme de terre (Leslie et Summerell, 2006 ; Pitt et Hocking, 2009). Cette espèce est considérée comme étant la principale espèce responsable de la fusariose des épis (Mc Mullen et al., 1997 ; Pereyra et al., 2004 ; Xu et Nicholson, 2009 ; Brown et al., 2010 ; Siou, 2013). Depuis les années 2000, des études phylogénétiques menées sur *F. graminearum* en utilisant des outils moléculaires et de séquençage, ont permis de diviser cette espèce en un complexe de 15 souches (Figure I.9) « FGSC = *Fusarium graminearum* species complex » (O'Donnell et al., 2000 ; O'Donnell et al., 2004 ; Ward et al., 2007 ; Starkey et al., 2007 ; O'Donnell et al., 2008 ; Yli-Mattila et al., 2009 ; Sarver et al., 2011) dont 14 ont été récemment identifiées par « Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) » (Siou, 2013) :

- *F. austroamericanum* (lignée 1), *F. meridionale* (lignée 2), *F. boothii* (lignée 3), *F. mesoamericanum* (lignée 4), *F. acaciaemearnsii* (lignée 5), *F. asiaticum* (lignée 6), *F. graminearum* (lignée 7), *F. cortaderiae* (lignée 8), *F. brasiliicum* (lignée 9 originaire du Brésil),
- *F. vorosii* (lignée 10 originaire du Japon et de Hongrie),
- *F. gerlachii* (lignée 11 originaire de la moitié ouest des Etats-Unis),
- *F. aethiopicum* (lignée 12 originaire d'Ethiopie),
- *F. ussurianum* (lignée 13 originaire de l'Est de la Russie) et,
- plus récemment, une nouvelle lignée (lignée 14) originaire du Népal a été isolée (Starkey et al., 2007 ; O'Donnell et al., 2008 ; Boutigny et al., 2011 ; Alvarez et al., 2011),
- *F. graminearum sensus stricto* (lignée 15) dominante sur une grande échelle en Europe et en Amérique (O'Donnell et al., 2008 ; Scoz et al., 2009 ; Alvarez et al., 2011).

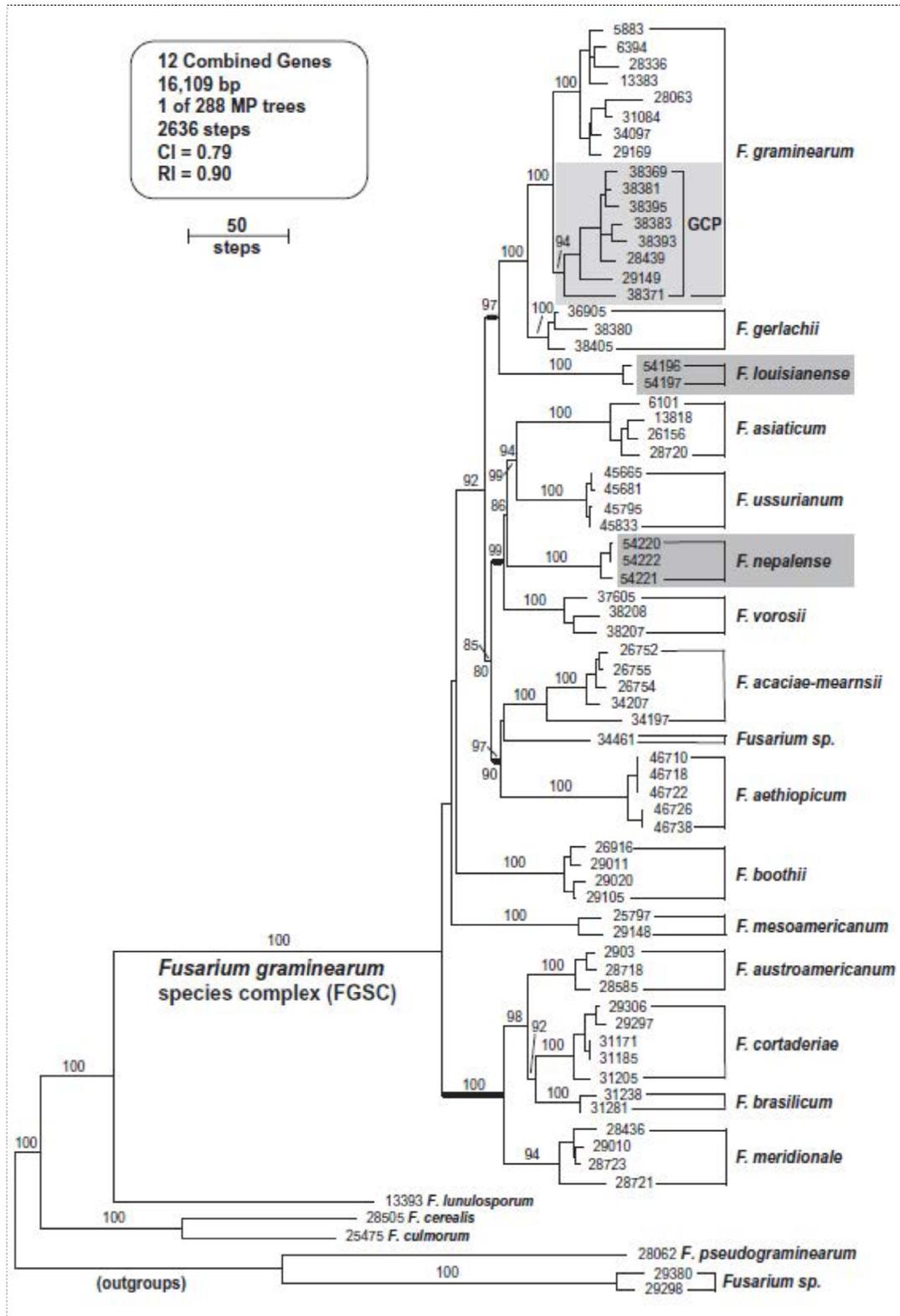


Figure I.9 : Arbre phylogénétique représentant les 15 espèces du complexe FGSC (Sarver et al., 2011).

Ces souches ne peuvent pas être distinguées morphologiquement et leur potentiel toxinogène ainsi que leur distribution géographique diffèrent. Elles peuvent être retrouvées ensemble à l'échelle de la région, de la parcelle et également sur un même épi où elles forment le complexe *F. graminearum* ou FGSC (Xu et Nicholson, 2009). De plus, leur agressivité diffère et semblerait en partie corrélée aux mycotoxines produites par la souche (Carter et al., 2002). Une étude menée en 2012 montra que *F. graminearum sensu stricto* est plus agressive que *F. boothii* sur blé (Malhipour et al., 2012).

F. graminearum se développe vite sur les géloses PDA et au malt. Les colonies floconneuses sont au début roses grisâtres ou rouges à pourpres, puis deviennent bruns vineux. Le revers est rouge à pourpre et le pigment diffuse dans la gélose (Jeunot, 2005 ; Leslie et Summerell, 2006 ; Pitt et Hocking, 2009 ; Turkington et al., 2016). Pitt et Hocking (2009) décrivent la colonie de cette espèce sur d'autres milieux de cultures. Sur milieu CYA, elle couvre l'ensemble de la boîte de Pétri et souvent jusqu'au couvercle, présentant ainsi un dense mycélium floconneux d'une couleur rose grisâtre, jaune grisâtre ou pâle. Habituellement, le revers est rouge orangé à rubis grisâtre, mais parfois, il est de couleur rose brun. A 5°C, la colonie a un diamètre de 5 à 12mm et ne croît pas à 37°C. La colonie sur MEA couvre l'ensemble de la boîte de Pétri et souvent même le couvercle présentant un thalle dense floconneux d'une couleur rose grisâtre et jaune grisâtre à brun doré ; le revers est brun orangé à brun jaunâtre, quelque fois pâle aux marges. Sur le milieu G25N la colonie est d'un diamètre de 20 à 30mm, occasionnellement plus. Sur DCPA, la colonie de cette espèce apparaît dominée par une couleur saumon à orange très pâle avec la présence des sporodochies au centre.

Les phialides (10 à 14 x 3,5 à 5µm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont absentes et les macroconidies à paroi épaisse sont fusiformes, droites à légèrement courbées et présentent 3 à 7 septum (moyennement 5). La cellule terminale est longue et pointue (25 à 62 x 2,5 à 5µm), alors que la cellule basale se distingue par la forme d'un pied (Pitt et Hocking, 2009). Les chlamydospores sont intercalaires formées par le mycélium et rarement dans les conidies (Botton et al., 1990 ; Tabuc, 2007) ; elles sont globuleuses, hyalines de couleur brun pâle (8 à 12µm en diamètre). Chez certains isolats, elles se forment tardivement. La **figure I.10** illustre l'aspect microscopique de *F. graminearum*. Dans la nature, *F. graminearum* est capable de former des périthèces superficiels ovoïdes et garnis de tubercules (140 à 250µm) sur un grand nombre de graminées. Les asques clavés et octosporés contiennent 8 ascospores hyalines ou brun très clair, fusiformes et triseptées (Botton et al., 1990 ; Jeunot, 2005 ; Tabuc, 2007).

La température optimale de la croissance de *F. graminearum* se situe entre 24 et 26°C en milieu liquide et solide à pH optimal variant entre 6,7 et 7,2 (Booth, 1971). L' A_w minimale lui permettant une croissance optimale, avoisine 0,90 à 15°C et à 25°C (Cuero et al., 1987 ; Ramirez et al., 2006). Le pH minimal est dépendant de la température, près de 3 à 25°C et 37°C et 2,4 à 30°C, alors que le pH maximal avoisine 9,5 à 30°C et est supérieur à 10,2 à une température plus basse (Wheeler et al., 1991).

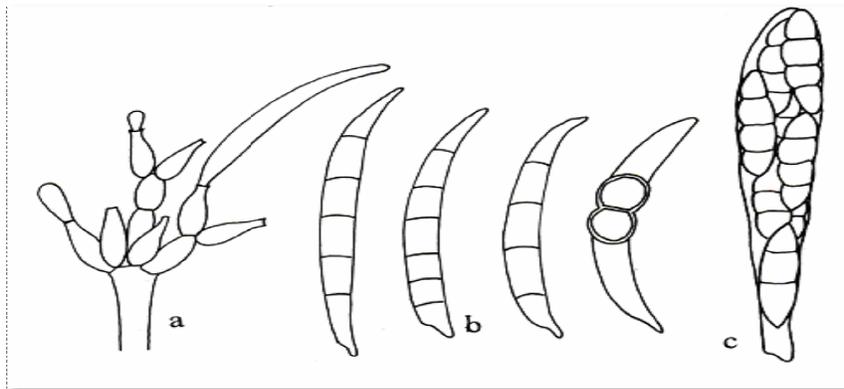


Figure I.10 : Vue microscopique de *F. graminearum*. (A) : macrophialides et macroconidies ; (B) : macroconidies et chlamydoconidies ; (C) : asque conidien (**Botton et al., 1990**).

G. zeae utilise un mode de reproduction homothallique caractérisé par la présence simultanée des deux formes du *locus*. Il est auto-fertile et peut donc, réaliser une reproduction sexuée avec lui-même ou avec d'autres individus (**Yun et al., 2000**). Ce type de mode reproductif peut être modifié génétiquement. La délétion de l'une ou de l'autre forme du locus MAT peut transformer *G. zeae* en champignon à mode de reproduction hétérothallique (**Lee et al., 2003**). Le produit de la reproduction sexuée est les ascospores formées dans des asques contenus eux même dans le *périthécium*. Cette structure sert de canon à spores. **Trail et al.** montrèrent en **2002**, que le mécanisme d'expulsion dans les asques serait lié à une augmentation de la pression interne et à un influx d'ion et de mannitol, et que la décharge de spores se réalisait préférentiellement en présence de lumière.

Les isolats de *F. graminearum* peuvent produire trois importantes toxines, à savoir : la zéaralénone, le nivalenol et le déoxynivalenol (**Leslie et Summerell, 2006**). Par ailleurs, **Pitt et Hocking (2009)** révélèrent que ces isolats sont capables de produire 50 composés toxiques comme les aurofusarines, les culmorines, la fusarine C, les stéroïdes et la fusarochromanone. Dans cette revue de thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement, au déoxynivalenol (DON).

Ramirez et al. affirmèrent en **2006**, que le DON est bio-synthétisé plus rapidement à 25°C, mais la quantité maximale a été enregistrée à 30°C. L' A_w adéquate pour la production de cette toxine est de l'ordre de 0,95 à 0,995. **Liorens et al. (2004)** rapportèrent que la température optimale de la synthèse du DON est de 28°C, et le 3-acetyl DON (3-ADON) est produit à une température optimale de 20°C et de 15°C respectivement.

Le DON appartient à la famille des trichothécènes qui comprend environ 150 composés classés par **Ueno** en **1985** selon leur structure chimique, en quatre groupes qui sont A, B, C et D (**Ponts, 2005 ; Merhej et al., 2011**). Les trichothécènes sont caractérisés par leur structure sesquiterpénoïde (15 carbones). Ils possèdent une double liaison en C9-C10 (**Balzer, 2003**) et une fonction époxyde en C12-C13 qui leur confère la dénomination de 12, 13 époxytrichothécènes (**Pinton, 2007**). La fonction époxyde est responsable de la toxicité des trichothécènes (**Boutigny, 2007 ; Merhej, 2010**). En plus du groupement

époxy, ils possèdent une fonction cétone en C8 (**Merhej et al., 2010**). Les trichothécènes-groupe B (TCTB) sont les plus souvent isolés sur les substrats naturels, principalement sur les céréales. Ainsi, leur accumulation est dépendante des conditions favorables au développement du phytopathogène qui les synthétise. La **figure I.11** illustre la structure chimique des deux importants trichothécènes du groupe B (DON et NIV) et de leurs formes acétylées. Notons qu'une souche fusarienne est capable de produire une seule toxine de TCTB avec sa (ses) forme(s) acétylée(s) ce qui lui confère son « Chémotype » caractéristique. En effet, certaines souches sont à Chémotype DON/ADON et d'autres sont à Chémotype NIV/FX. Ceci est dû à la séquence du gène impliqué dans la détermination du Chémotype qui encode un allèle orientant vers la synthèse de l'un ou l'autre des deux Chémotypes.

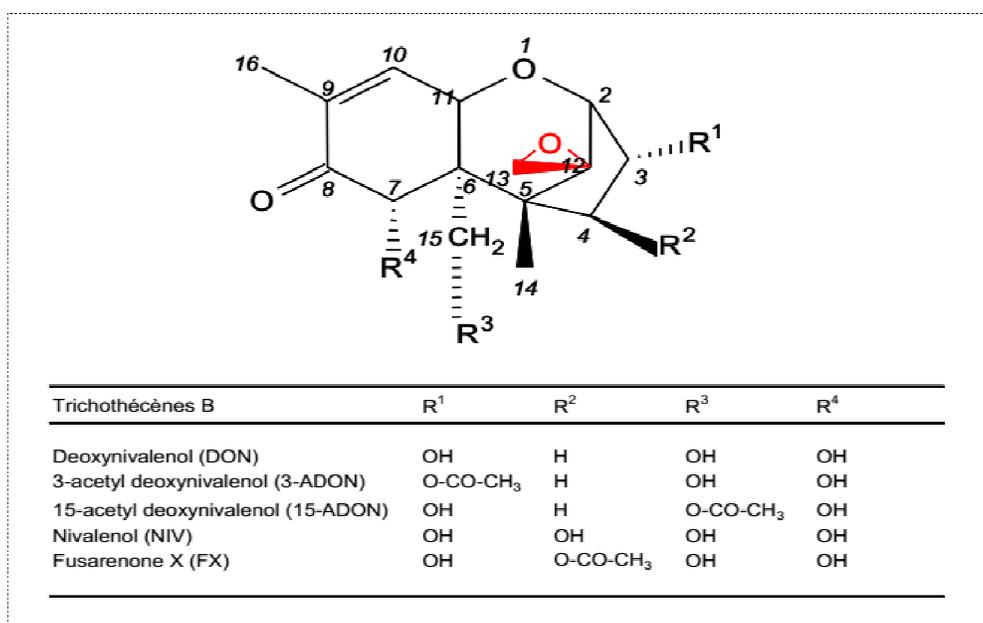


Figure I.11 : Structure chimique des trichothécènes du groupe B (**Boutigny, 2007**).

Les trichothécènes sont incolores, cristallisables, solubles dans les solvants modérément polaires et faiblement solubles dans l'eau. Ils sont stables à 120°C, modérément stables à 180°C et se décomposent en 30 minutes à 210°C. Ces molécules synthétisées en plein champ, sont très difficiles à éliminer et représentent un risque potentiel important dans l'alimentation humaine et animale (**Balzer, 2003**). **Widestrand** et **Pettersson** déclarèrent en, **2001**, que quatre trichothécènes, notamment T-2, HT-2, DON et NIV se trouvent plus stables dans l'acétonitrile et il y'a peu de dégradation de ces toxines même après 24 mois de stockage à 25°C ou pendant 3 mois à 40°C. De plus, DON et NIV sont relativement stables à des pH de 1 à 10 et leur destruction ne peut être réalisée qu'à pH 12 à 80°C (**Lauren et Smith, 2001**).

Le déoxynivalénol ou 3 α ,7 α ,15-Trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one, porte également le nom de « vomitoxine » (**Waché, 2009**). Cette dénomination lui a été attribuée

par **Vesonder** et son équipe en **1973** en raison de sa capacité d'induire, à fortes concentrations, des vomissements chez les animaux. Il a été caractérisé après son isolement par une équipe japonaise à partir d'orge infecté par *F. graminearum* (**Morooka et al., 1972**), et retrouvé aussi dans du maïs infectés par les espèces fusariennes (**Vesonder et al., 1973**). Le squelette carboné du DON est composé d'un cyclopentane, d'un cyclohexane, et d'un cycle à 6 chaînons oxygénés et 4 groupements méthyles. Contrairement aux trichothécènes du groupe A, le DON ne possède pas de cétone en position C8 (**Figure I.12**). Sa formule brute est $C_{15}H_{20}O_6$. Il est soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'eau et le chloroforme. Sa biosynthèse à l'instar des autres trichothécènes, est un processus complexe impliquant de nombreuses étapes d'oxygénation, d'isomérisation et d'estérification (**Jenning et al., 2004**). La **figure I.13** illustre les étapes de la production des trichothécènes.

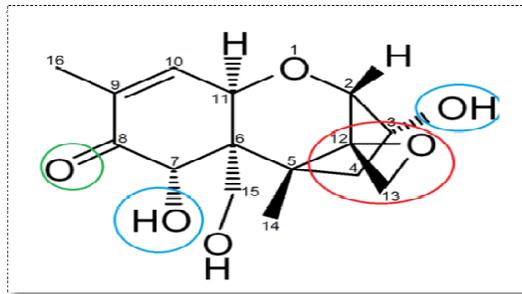


Figure I.12 : Structure chimique générale du déoxynivaléno. ○ Groupement spécifique aux TCTB; ○ Groupement spécifique au DON; ○ Groupement principal responsable de la toxicité (**Saint-Cyr, 2013**).

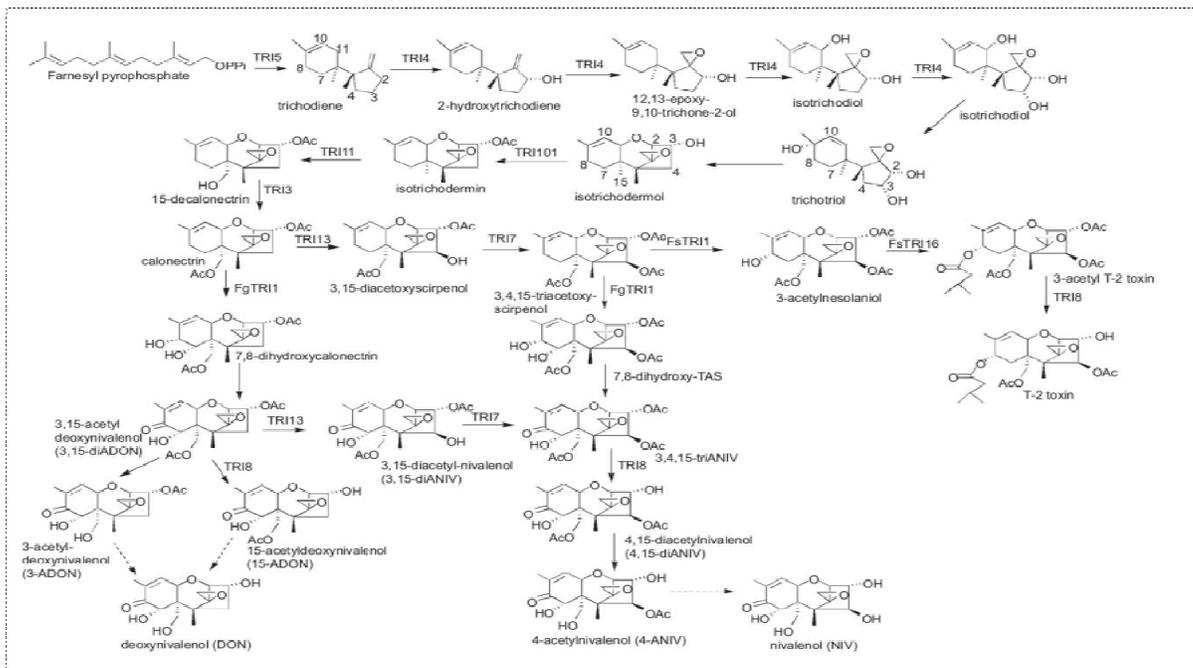


Figure I.13 : Voie de la biosynthèse des trichothécènes (**McCormick et al., 2011**). Les gènes codant pour une étape enzymatique sont identifiés à côté des flèches indiquant l'étape. Les flèches discontinues indiquent des étapes pour lesquelles aucun gène ne lui a encore été assigné.

Le déoxynivalénol a des effets néfastes variés. Il provoque des vomissements aussi bien chez l'homme que chez l'animal, ce qui conduit à une anorexie. Toutes les gents animales ne présentent pas la même sensibilité au DON (**Rotter et al., 1996**). L'animal le plus sensible s'avère être le porc, puis viennent les rongeurs, les volailles et les ruminants (**Pinton et al., 2012**). Les effets observés sont liés à l'activité propre de la molécule, mais également à la façon dont elle est métabolisée (**Pinton, 2007**). Selon **Pestka et Smolinski (2005)**, une exposition de souris à des concentrations élevées en DON (≥ 27 mg/kg de poids vif) provoque des effets de détresse abdominale, salivation importante, malaise, diarrhée, vomissements, leucocytose et hémorragie gastro-intestinale ou même l'apoptose. En revanche, chez le porc, des effets émétiques sont observés à des doses beaucoup plus faibles, soit [DON] ≥ 50 μ g/kg de poids vif (**Forsyth et al., 1977**).

Par ailleurs, l'effet est d'autant plus marqué que l'exposition au DON se fait de manière ponctuelle plutôt que chronique. En effet, bien que le DON soit considéré comme l'un des trichothécènes les moins toxiques, ses pouvoirs émétiques et anorexiques sont supérieurs ou égaux à ceux des trichothécènes les plus toxiques (**Pestka et Smolinski, 2005**). Il semble que les effets du DON sur l'anorexie et les vomissements soient la conséquence d'une altération du métabolisme de la sérotonine (**Rotter et al., 1996**). Des niveaux élevés de sérotonine ou de ses métabolites ont été retrouvés chez des animaux ayant reçu du DON (**Prelusky et al., 1992**), et des antagonistes des récepteurs de la sérotonine peuvent réduire les vomissements induits par DON (**Prelusky et Trenholm, 1993**).

Entre autre, plusieurs études ont confirmé l'absence de risque mutagène lié à la présence de DON dans l'alimentation animale. **Rogers et Heroux-Metcalf** déclarèrent, en **1983**, que des concentrations allant jusqu'à 3 μ g de DON/ml n'ont pas d'effet mutagène sur des cellules du hamster V79. **Knasmuller** et ses collaborateurs décrivent en **1997**, une augmentation des anomalies chromosomiques dans des hépatocytes de rat en culture primaire traités 3h par une concentration de 1 μ g/ml de DON.

L'impact du DON sur la reproduction a été évalué chez différentes espèces. A titre d'exemples, chez la souris, l'exposition par gavage des animaux entre le 8^{ème} et le 11^{ème} jours de la période de gestation entraîne une résorption significative des embryons pour des doses supérieures à 2,5mg/kg de poids vif, voire complète pour des doses plus importantes [10 à 15mg/kg de poids vif] (**Khera et al., 1982**). Chez le rat, l'exposition à des doses $\leq 0,5$ mg/kg/jr durant toute la période de gestation n'a pas entraîné d'effets sur la croissance ni sur le développement du fœtus (**Morrissey et al., 1987**) ; pendant qu'une exposition à la dose de 20mg/kg/jr durant 60 jours avant et pendant la gestation induit à une diminution significative de la fertilité (**Morrissey et Vesonder, 1985**). Chez les poules, une alimentation contaminée par une dose de 4,9mg/kg n'a pas d'effet sur le nombre d'œufs ni sur le nombre d'embryons morts ou anormaux (**Hamilton et al., 1985**). Chez le porc, **Chavez (1984)** et **Friend (1986a, b et c)** montrèrent que le nombre de porcelets mort-nés, la taille et le poids de portée, le poids des porcelets à la naissance et au sevrage ne sont pas affectés par l'ingestion du DON par les mères. Cependant, **Friend et son équipe (1983)**

notèrent une diminution de la longueur des fœtus âgés de 52 jours lorsque leur mère a été exposée à un aliment contenant 3,45mg/kg de DON.

En outre, le déoxynivalenol possède également des effets sur le système nerveux et le système immunitaire. Il a été montré une influence de la toxine sur un facteur de transcription critique intervenant dans les réactions immunitaires de type inflammatoire (**Ouyang et al., 1996**). Les travaux qui ont abordé les effets des trichothécènes sur la résistance de l'hôte, la réponse humorale ou l'immunité à médiation cellulaire montrent notamment qu'en fonction de la dose et de la fréquence d'exposition, ces toxines entraînent soit une immuno-stimulation ou une immuno-dépression (**Bondy et Pestka, 2000**). En effet, l'exposition à de fortes doses en DON affecte les organes dans lesquels la prolifération cellulaire est intense (moelle osseuse, ganglions lymphatiques, rate, thymus et muqueuse intestinale) en provoquant une immuno-dépression (**Ueno, 1984**). En revanche, l'exposition à de faibles doses peut augmenter la résistance à certains pathogènes et provoquer une augmentation de la concentration sérique en immunoglobulines de classe A [IgA] (**Pinton, 2007**).

Les effets réels et potentiels des moisissures et de leurs toxines, notamment des *Fusarium* et des fusariotoxines, imposent aux acteurs ayant un rôle dans la sécurité alimentaire à trouver des solutions préventives afin de réduire, voire éradiquer ces dangers mycotoxycologiques. En effet, en l'absence de procédés de décontamination efficaces et applicables permettant de lutter de façon curative contre les moisissures et leurs toxines associées, il est primordial d'agir par des moyens préventifs en amont pour pouvoir limiter la production de ces toxines au champ.

Les stratégies de prévention couramment utilisées sont d'ordre agronomique. Certaines méthodes culturales, notamment la rotation des cultures, l'enfouissement des résidus sont susceptibles d'influer sur les facteurs qui sont à l'origine de la fusariose et de la production de mycotoxines (**Champeil et al., 2004 ; Edwards, 2004**). Pour **Champeil et al. (2004)**, la rotation avec des cultures comme le soja ou le colza diminuerait l'infection des cultures céréalières par la fusariose. En effet, l'apparition de la fusariose serait plus importante si les cultures précédentes sont du blé dur, de l'avoine ou du maïs que du blé ou de l'orge. L'enfouissement des résidus de culture antérieure constitue également un moyen de lutte contre l'incidence de la fusariose en réduisant les sources d'*inoculum* qui sont de l'ordre de trois (**Rioux, 2015**) :

1. les résidus de culture infectés durant l'année précédente en particulier, les tissus qui se dégradent plus difficilement comme les nœuds (**Osborne et Stein, 2007**). La survie des champignons sur ces résidus peut atteindre plus de deux ans après la récolte ce qui les classe en « *source à long terme* » ;
2. les précédents culturaux les plus à risque, sont les cultures hôtes de la fusariose comme le maïs, le blé et l'orge. Dans la partie la plus profonde du sol, seules les chlamydospores peuvent subsister jusqu'à quatre ans ; ces spores ont une vie ralentie

et une paroi épaisse leur permettant de résister longtemps à la sécheresse et à l'asphyxie (**Caron, 1993**) ;

3. les semences infectées : lors des infections sur épi, le mycélium attaque les grains à travers les glumes et pénètre dans le péricarpe, l'albumen puis l'embryon. Cette source d'*inoculum* permet à la maladie de se développer dès l'automne. Pendant la germination, le mycélium reprend son activité et selon le degré de pénétration initial, il ralentit ou inhibe la germination entraînant des manques à la levée et la fonte des semis.

La production de spores infectieuses à partir des déchets végétaux présents dans les champs est la première étape du cycle infectieux de *F. graminearum*. Il convient donc de ne pas réutiliser les déchets végétaux pour fumer les cultures (**Hatsch, 2004**). Selon le même auteur, il est recommandé de semer les céréales dans un sol bien travaillé. Idéalement, le sol doit favoriser une germination et une levée rapide, de cette manière la jeune plante peut être plus robuste pour faire face à une infection. De plus, une pratique d'alternance des cultures apporte des effets bénéfiques compte tenu de la préservation nécessaire des ressources du sol et induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes (**Hatsch, 2004**). D'autre part, la culture de variétés résistantes est à privilégier, et un bon travail du sol permet l'enfouissement des résidus et donc limiter les risques de l'apparition de la maladie (**Siou, 2013**).

Une fois la culture installée, le recours à la lutte chimique est toujours possible, mais avec une efficacité limitée. Toutefois, appliqué à la bonne dose et au bon stade, un traitement à l'aide d'un produit spécifique est un levier supplémentaire pour lutter contre la fusariose. En effet, les travaux de **Simpson et al. (2001)** soulignent la sensibilité des champignons du genre *Fusarium* aux triazoles. De nouvelles solutions ont été développées couplant plusieurs familles chimiques comme les triazolinthione et triazole qui peuvent réduire jusqu'à 70% la maladie au champ (**Pirgozliev et al., 2003 ; Diguta, 2010**). Cependant, la diversité des agents pathogènes ainsi que les différents effets d'efficacité des matières actives d'une espèce à l'autre complexifient cette lutte (**Siou, 2013**). De plus l'utilisation excessive et irrationnelle des produits chimiques, notamment des fongicides, a joué un rôle important dans l'apparition de souches résistantes et plus virulentes et de ce fait, à l'insécurité du consommateur.

Depuis quelques années, le monde agricole s'oriente vers une agriculture durable, raisonnée et sans produits chimiques afin de préserver l'environnement et d'améliorer la sécurité alimentaire du point de vue quantitatif et qualitatif tout en développant le concept de la protection biologique intégrée ou de la lutte biologique (**Picard, 2000**). Le biocontrôle suscite ces dernières années l'intérêt croissant des scientifiques et fait appel à diverses techniques de recherche *in vitro* et *in vivo* qui font appel à l'utilisation des systèmes biologiques et aux microorganismes sains.

Dans ce sens, au cours des essais réalisés aux champs, **Khan et al.** ont rapporté, en **2004**, que les levures du genre *Cryptococcus* sont capables de diminuer la sévérité de la fusariose de 50 à 60%. **Yates et al.** Montrèrent, en **1999**, que *Trichoderma viride*, une moisissure isolée des racines du maïs et Co-cultivée sur grain de maïs avec *F. verticillioides*, pourrait inhiber de 46 % la croissance de cette dernière au bout de 6 jours, et de 90% après deux semaines. Cette inhibition s'accompagnerait d'une réduction de 85% de la production de FB1. Une compilation des études qui présentent *T. viride* comme agent de bioprotection a été publiée par (**Papavizas, 1985**).

Par ailleurs, plusieurs travaux de recherche ont rapporté que la présence simultanée de plusieurs espèces fongiques dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacune des moisissures productrices. Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite par une souche d'*A. flavus* est réduite quand cette dernière est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*A. parasiticus*, ceci, même si la souche d'*A. parasiticus* est une souche non toxigène (**Pfohl- Leszkowicz, 2001**). La présence de *F. verticillioides* sur les épis protège le maïs d'une contamination ultérieure avec *A. flavus* et réduit la quantité d'aflatoxines produites (**Zummo et Scott, 1992**). En **1988**, **Mislivec** a démontré expérimentalement, que la culture simultanée d'*A. parasiticus* et d'*A. flavus* ne modifie pas la production d'aflatoxines par ce dernier ; alors que la présence d'espèces de *Penicillium* diminue la production de cette toxine. Dans le même sens, la production d'aflatoxines par *A. flavus* est inhibée par la présence d'*A. niger* (**Horn et Wicklow, 1983**).

En **2006**, **Fakhrunnisa-Hashmi et Ghaffar** ont réalisé une étude *in vitro* sur les interactions entre des espèces fusariennes (*F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *F. sporotrichioides*, *F. moniliforme*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. equiseti*, *F. longipes*, *F. scirpi* et *F. solani*) et d'autres espèces appartenant à d'autres genres fongiques. Les résultats obtenus ont révélé que *Trichoderma hamatum* avait un important effet inhibiteur sur la croissance de *Fusarium spp.* qui oscille entre un taux minimal de 5,88% (*T. hamatum* vs *F. equiseti*) et un taux maximal de 79,97% (*T. hamatum* vs *F. oxysporum*). A la même année, **Sempere et Santamarina** ont utilisé les techniques de la microscopie optique et électronique à balayage cryogénique pour analyser des interactions entre *Alternaria alternata* et *Nigrospora oryzae* à différentes températures (15 et 25°C) et à différentes A_w (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 et 0.995). Les résultats ont montré qu'aucune des deux espèces en Co-culture n'a dominé le milieu de culture, leur croissance maximale individuellement et en duo a été enregistrée à A_w 0.995 et à 25°C.

En **2007**, **Rojo et al.** évaluèrent l'effet de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 et *T. longibrachiatum* ITEM 3635 sur la croissance de *F. proliferatum* et la production de fumonisine B1, fusaproliferine et beauvericine par ce dernier sur milieu Maïs Meal Agar (A_w 0.995). Ils ont montré que *T. harzianum* ITEM 3636 a réduit considérablement, la croissance mycélienne de *F. proliferatum*, pendant que *T. longibrachiatum* ITEM 3635 a montré un faible effet antagoniste contre le pathogène. Pour ce qui concerne leur effet antimycotoxique, le taux de fumonisine B1 mesuré par HPLC, a été réduit de 98% et de

88% par *T. harzianum* ITEM 3636 et *T. longibrachiatum* ITEM 3635 respectivement. D'un autre côté, la concentration de beauvericine et celle de fusaproliferine produites durant 30 jours de Co-incubation de *F. proliferatum* avec les deux espèces de *Trichoderma* n'a pas différé de celle produite par *F. proliferatum* cultivée seule.

Les recherches de **Sempere et Santamarina** réalisées en **2010**, sur l'effet antagoniste de *P. oxalicum* envers *A. alternata* sous différentes température, A_w et plusieurs milieux de culture, ont révélé en se basant sur l'indice de dominance, que *P. oxalicum* s'avère plus compétitif qu'*A. alternata* à 25°C et à A_w 0,98. Notons qu'*A. alternata* a montré un taux de croissance maximal à 25°C et à A_w 0,995. Sur le plan microscopique, *P. oxalicum* s'est comporté comme un mycoparasite d'*A. alternata* sous l'ensemble des conditions testées. En **2015**, **Sarkar et al.** ont testé l'effet antagoniste de *Trichoderma sp.* sur *Pestalozzia theae* Saw (agent pathogène du thé) et ont révélé que l'agent antagoniste a inhibé la croissance du pathogène avec un pourcentage de 84,45±0.77% après 72h de Co-culture. Ceci, selon les auteurs, est dû probablement, à la capacité de l'antagoniste de sécréter des métabolites secondaires à effet répresser. D'autre part, *Trichoderma sp.* a été qualifié de mycoparasite. **Shang et al.** suggèrent en **2019**, que l'utilisation des souches atoxinogènes pour la lutte contre la toxicité des moisissures et la production des toxines sur plusieurs substrats alimentaires (maïs, cacahuètes et les noix) s'avère la stratégie la plus efficace et la plus saine en lutte biologique.

Les interactions fongiques sont un important facteur qui influence directement la croissance mycélienne des moisissures ainsi que la production des toxines associées. Une interaction est une coaction qui peut s'établir entre deux moisissures (**Doghri, 2015**); autrement dit, c'est l'effet qu'à une espèce microbienne sur le taux de la croissance d'une autre espèce. Ces coactions peuvent avoir un effet positif, neutre ou négatif (**Figure I.14**). Les interactions microbiennes peuvent être directes comme indirectes :

1. **La symbiose** est une coaction positive pour les deux êtres vivants de la même espèce ou d'espèces différentes. Il s'agit d'une association naturelle à bénéfice réciproque (**Gastelum-Martinez, 2012**). Parfois nous parlons de symbiose, de mutualisme mais aussi, de coopération. Au cours du **Mutualisme**, deux micro-organismes sont capables de vivre indépendamment l'un de l'autre, mais peuvent tirer un profit mutuel d'un éventuel voisinage (**Curl et Tmelove, 1986**). Dans le cas de la **Coopération**, les deux espèces bénéficient de l'association sans obligation, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment l'un de l'autre.
2. **Le commensalisme** pour ce qui le concerne, est une interaction bénéfique pour l'un et neutre pour l'autre. En effet, une espèce en tire un profit pour sa croissance et l'autre ne tire ni bénéfice ni effet délétère de cette association. Selon **Gastelum-Martinez (2012)**, durant cette interaction positive, un microorganisme est capable de produire un composé à un effet positif sur la croissance de l'autre micro-organisme ou il peut consommer une substance qui est capable d'inhiber la croissance de l'autre espèce/souche.

3. La troisième coaction entre les microorganismes est une interaction positive pour une espèce et négative pour la seconde espèce ; elle peut être :
 - **du parasitisme** qui fait profiter abondamment, à l'espèce A de l'association au dépend de l'espèce B qui n'arrive pas à se développer et peut finir par disparaître mais pas nécessairement ; ou
 - **de la prédation** qui se traduit quand l'un est prédateur sur l'autre pour aboutir à la disparition de l'un d'eux.
4. **Le neutralisme** qui est une cohabitation des microorganismes les uns avec les autres sans affecter les taux de croissance des deux sujets.
5. **L'amensalisme** reflète l'effet neutre qu'exerce la première espèce sur l'autre, cependant, quand cette dernière exerce un effet négatif sur la première, nous parlons alors, de **l'antagonisme**.
6. **La compétition** est une coaction à effet délétère pour le taux de croissance des deux microorganismes. Elle a très souvent, un lien avec des ressources nutritives que les microorganismes doivent partager (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

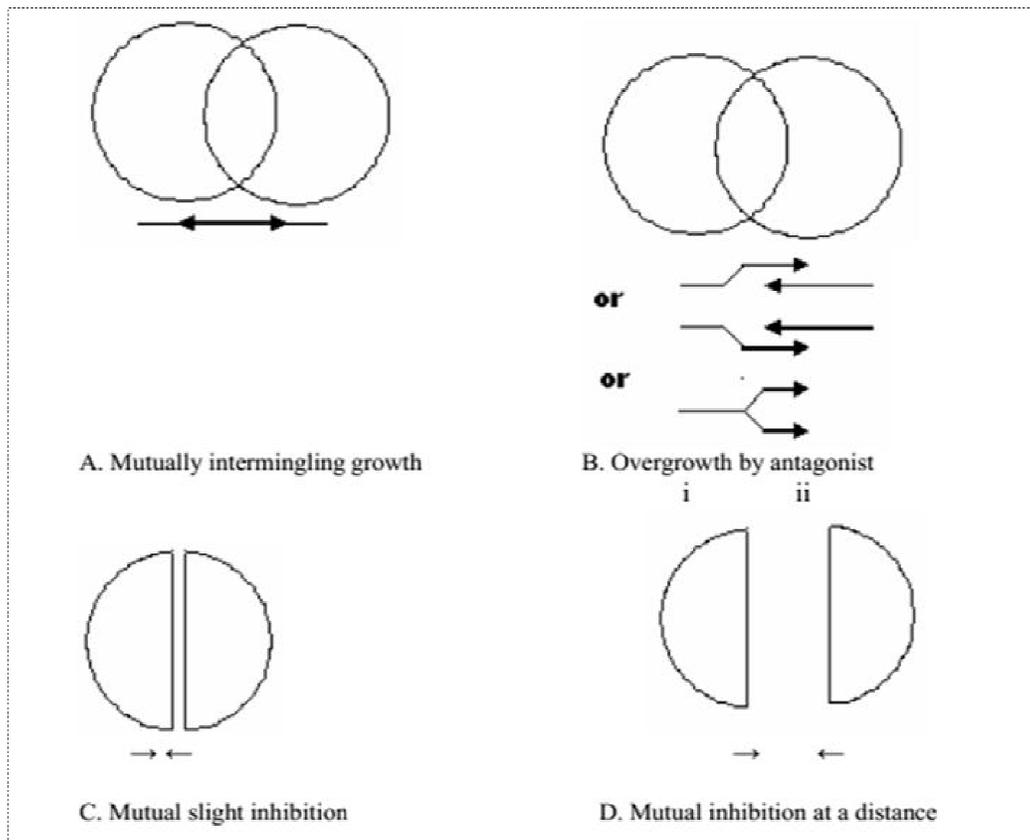


Figure I.14 : Différents modes d'interaction entre deux espèces fongiques sur milieu gélosé (**Fakhrunnisa-Hashmi et Ghaffar, 2006**).

Les interactions fongiques sont souvent utilisées dans la lutte biologique. Cependant, la pathogénécité de l'*inoculum* sporale et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique, principalement, celui de l'antagoniste. Les micro-champignons sont des agents de lutte très intéressants du fait de leur aptitude à infecter l'hôte par simple contact (**Carruthers et Soper, 1987**). Ils peuvent être produits en masse à moindre coût et être appliqués avec les méthodes conventionnelles. Cependant, les principaux facteurs limitant leur utilisation en champ sont d'ordre abiotique et vont entraîner la perte d'efficacité de l'*inoculum* fongique sur le couvert végétal. Les effets de certains facteurs sur la viabilité des conidies ont été très étudiés comme la température (**Bennett, 1977 ; Doberski, 1981 ; Stathers et al., 1993**) et l'humidité (**Fargues, 1972 ; Hall et Papierok, 1982 ; Ramoska, 1984 ; Riba et al., 1984 ; Khachatourians, 1986**). Le schéma ci-après représente les relations interactionnelles entre l'agent pathogène, l'agent antagoniste et la plante hôte.

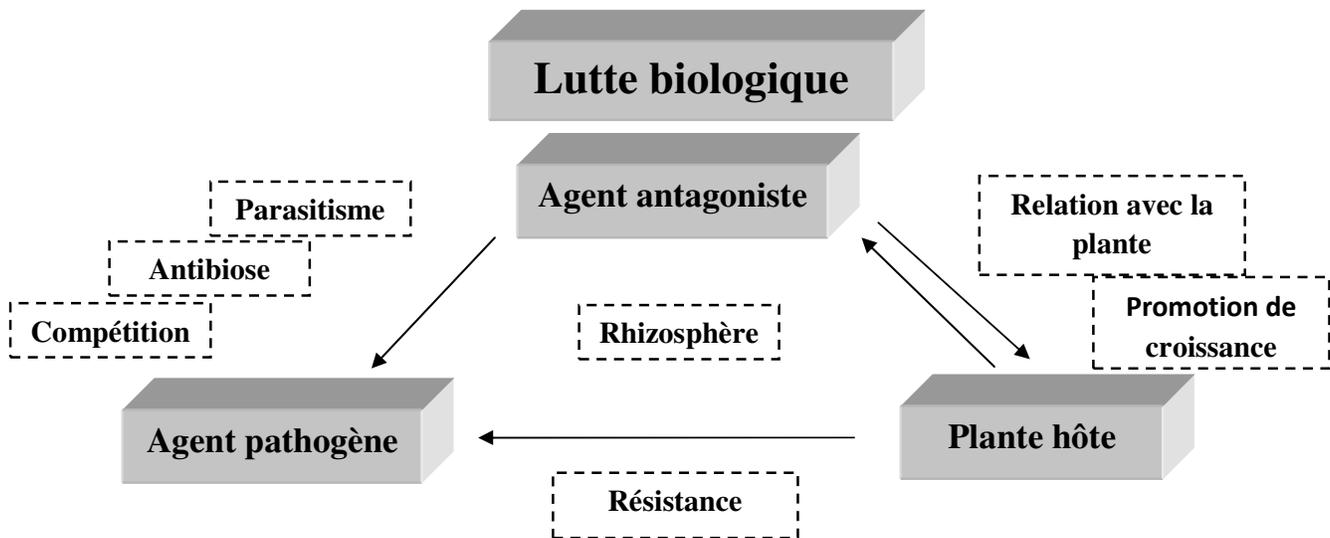


Figure I.15 : Diagramme représentatif des relations plante hôte-agent pathogène-agent antagoniste (**Lefort, 2010**)

L'antagonisme microbien qui pourrait garantir une bonne qualité sanitaire des céréales a été aussi recherché au sein de certaines souches bactériennes principalement, lactiques. Elles sont isolées de l'environnement et/ou de tout type de substrat alimentaire comme le maïs (**Cavaglieri et Etcheverry, 2002 ; Dalié et al., 2012**), le lait (**Ouidir et al., 2019**), le lait fermenté (**Belal et al., 2011 ; Shehata et al., 2019**), la viande, les végétaux, le poisson (**Nascimento et al., 2019 ; Iseppi et al., 2019 ; Salomskiene et al., 2019**) et les céréales fermentées (**Merabti et al., 2019 ; De Oliveira Coelho et al., 2019**).

Les recherches sur l'activité antifongique chez les bactéries lactiques ont commencé à la fin des années 50 avec **Guillo (1958)**. Il découvrit un produit actif synthétisé par *Lactobacillus acidophilus* ayant un effet inhibiteur contre *Conidia albicans*. En **1981**, **Wiseman et Marth** démontrèrent que *Streptococcus lactis C10* était capable d'inhiber *A. parasiticus* par le biais d'une molécule non connue à cette époque. Actuellement, plusieurs

équipes de recherche ont pu identifier plusieurs substances antifongiques produites par les bactéries lactiques. Il est rapporté que le genre *Lactobacillus* est le plus pertinent en matière de lutte antifongique et anti-mycotoxique (Luchese et Harrigan, 1990), suivi des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* puis des *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella* ; pendant que les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins intéressants.

Private et Thonart ont montré en **2011** que l'acide phényllactique (en quantités inférieures à 7,5mg/ml) et l'acide 4-hydroxy-phéyllactique produits par *Lactobacillus plantarum* 21B, avaient une activité antifongique efficace contre *A. niger*, *A. flavus*, *P. corylophilum*, *P. expansum* et *F. graminearum*. Ils ont même noté l'effet des mêmes substances produites par la souche *Lb. plantarum* 20B vis-à-vis d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Monilia*. Par ailleurs, ils ont déclaré qu'une gamme d'acides organiques tels que les acides acétique, formique, caproïque, propionique, butyrique et valérique produits par *Lb. sanfranciscensis* CB1et *Lb. plantarum* possèdent le même effet contre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Monilia*. Ces acides agissent d'une manière synergique.

Belal et al. déclarèrent en **2011**, que des souches de *Lb. fermentum* 007, *Lb. paracasei* D5, *Lb. pentosus* G004 et *pediococcus pentosus* TE010 ont été capables de produire des substances antifongiques efficaces de nature protéique vis-à-vis d'*A. niger* et d'*A. oryzae*.

Laref et Guessas (2013) ont montré une bonne activité antagoniste fongique de six souches de *Lactobacillus* isolées du lait de chamelle, de la carotte et d'ensilage vis-à-vis d'*Aspergillus sp.* par la méthode de double couche et de confrontation. Par contre, aucune inhibition n'a été détecté par le surnageant de ces isolats. Les substances produites par *Lb. plantarum* et *Lb. farciminis*, résistent aux enzymes protéolytiques et à la température et montrent une forte activité à pH 2 ; ils peuvent également, inhiber d'autres champignons tels que *F. roseum*, *Stemphylium sp.* *Trichoderma sp.* et *Penicillium sp.*

La plupart des travaux sur la caractérisation de ces antagonistes ont été réalisés *in vitro*, parfois vérifiés par des essais sous serre et beaucoup plus rarement à l'aide d'expérimentations en plein champ. Seuls de tels essais permettent de valider l'efficacité de l'agent antagoniste et de s'assurer de l'absence d'impact environnemental. Dans la définition de stratégies de biocontrôle, il est aussi indispensable de garder en mémoire que la production de mycotoxines par un agent fongique correspond souvent à une réponse à un stress et la présence d'un antagoniste fongique ou bactérien peut être perçue comme un stress par la souche toxigène qualifiée d'agent pathogène. Dans ce sens, **Dalié et al.** ont démontré, en **2012**, que dans certaines conditions *in vitro* la présence d'une souche de *Pediococcus* inhibitrice de la croissance fongique de *F. graminearum* pouvait stimuler la production de fumonisines avec une quantité nettement supérieure à celle produite par la souche fongique cultivée comme témoin.

Divers genres, notamment, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* ont été étudiés pour leur activité probiotique et sont généralement reconnus comme sains [Generally Recognized As Safe (GRAS)] (**Balciunas et al., 2013**). Les bactéries lactiques interviennent par le biais de substances de nature peptidique qu'elles synthétisent et qui ont largement prouvé leur pouvoir antimicrobien (**Favaro et al., 2014**). Nous citons, à titre d'exemple les composés antifongiques (propionate, phenyl-lactate, hydroxyphenyl-lactate, dipeptides cycliques, etc) et les bactériocines (nisin, reuterin, reutericyclin, pediocin, lacticin et enterocin). De plus, elles sont capables de produire plusieurs types d'acides organiques comme l'acide lactique, a. acétique, a. formique et l'a. propionique qui intensifient leur action de bio-préservation en diminuant le pH du milieu (**Favaro et al., 2015**).

En effet, au cours de la lyse cellulaire, il est possible qu'elles libèrent des molécules qui inhibent la croissance des moisissures et conduisent à une baisse de l'accumulation de leurs mycotoxines (**Dalié et al., 2012**). Ces métabolites anti-mycotoxinogènes pourraient également être produits pendant la croissance des LAB. A l'aide d'un test de dialyse, ces auteurs ont démontré la présence d'un métabolite qui inhibe l'accumulation de l'aflatoxine dans des extraits sans les cellules de *Lactobacillus*. Il a été suggéré que cette inhibition n'était pas le résultat d'une production de peroxyde d'hydrogène ou d'une baisse du pH (**Dalié, 2010**). Ces résultats étaient cohérents avec ceux de **Gourama (1997)** qui a suggéré que l'inhibition de la biosynthèse de l'aflatoxine par les surnageants exempts de cellules de *Lactobacilles* était probablement due à un métabolite extracellulaire.

Coallier-Ascah et Idziak ont signalé, en **1985**, que l'inoculation de spores d'*A. flavus* avec une culture de *Streptococcus lactis* dans un bouillon Lab-lemco-tryptone entraînait une accumulation minimale ou nulle de l'aflatoxine, même si la croissance du champignon n'a pas été inhibée. Ils ont montré, également, que la baisse du pH et la réduction des niveaux de nutriments dans le milieu en raison de la croissance de *S. lactis* ne sont pas la cause de l'inhibition observée et elle n'a pas été éliminée par l'addition d'hydrates de carbone. Les niveaux d'aflatoxine étaient également nettement réduits lorsque *S. lactis* a été inoculé à une culture d'*A. flavus* en croissance. L'inhibition de la production d'aflatoxine par *S. lactis* résulterait de la présence d'un composé thermostable de faible poids moléculaire caractérisé comme étant un phosphoglycolipide contenant un noyau aromatique (**Coallier-Ascah, 1981**).

Rasic et al. (1991) ont observé une diminution des taux de l'AFB1 dans le yaourt et le lait acidifié. Les taux de AFB1 ajoutés au lait avant fermentation à des concentrations allant de 600, 1000 et 1400 µg/kg ont été réduits respectivement de 97%, 91% et 90% dans le yaourt à pH 4.

Piotrowska et Zakowska (2005) ont examiné vingt-neuf (29) souches appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Lactococcus* pour leur capacité à éliminer l'ochratoxine A dans les milieux liquides. Toutes les souches testées ont pu réduire la concentration d'ochratoxine

A. *Lb. acidophilus* CH-5, *Lb. Rhamnosus* GG, *Lb. Plantarum* BS, *Lb. Brevis* et *Lb. sanfranciscensis* ont pu réduire la concentration en ochratoxine A de 50%.

Niderkorn et al. (2006) ont testé la capacité de vingt-neuf (29) souches lactiques à éliminer le désoxynivalénol (DON), les fumonisines B1 et B2 (FB1, FB2) et le zéaralénone dans le bouillon MRS acidifiés (pH 4). Les résultats obtenus ont révélé une diminution de 55% pour le DON, 82% pour le FB1, 100% pour le FB2 et 88% pour le zéaralénone. A des concentrations bactériennes similaires, *Lb. rhamnosus* GG et R0011 ont éliminé le DON avec une efficacité de 54% et 30%, respectivement. De même, la souche de *Lb. lactis* CS₄₃ l'a éliminé 23% du DON, tandis que la souche CS₂₀₂ l'a éliminé jusqu'à 40%.

Rather et al. (2013) ont démontré le potentiel de *Lb. plantarum* de biocontrôler la croissance d'*A. niger* sur les grains de soja. Au cours de cette expérience, ils ont noté qu'une application du surnageant concentré de cette culture bactérienne aux grains, empêche la croissance d'*A. niger*. En 2014, les peptides antimicrobiens de *Lb. plantarum* LR₁₄ ont été utilisés pour prévenir l'altération fongique du blé en conditions de stockage (**Gupta et Srivastava, 2014**). Une souche de *Pediococcus* sp A₁₉ utilisée comme agent de biocontrôle lors de la fermentation du cacao a inhibé trois champignons producteurs d'ochratoxines (**Ngang et al., 2014**).

Le **tableau I.3** résume l'effet antifongique et anti-mycotoxique de quelques bactéries lactiques et le composé actif causant cet effet. Ceci, pour la période 2010/2020.

La capacité des bactéries lactiques à s'adapter à différents substrats et aux conditions biotiques et abiotiques les plus extrêmes, les qualifie de candidats de biocontrôle les plus prometteurs. Cependant, bien que la lutte biologique comme alternative à la lutte chimique pour limiter la fusariose et la contamination des grains en mycotoxines, pourrait être une voie d'avenir ; le choix d'agents antagonistes doit répondre aux normes de la sécurité sanitaire du consommateur d'où l'importance de vérifier l'absence d'effets contraires ou néfastes avant toute introduction dans une formulation de produit à consommation humaine et/ou animale.

Tableau I.3 : Effet antifongique et anti-mycotoxique de quelques bactéries lactiques et de leur composé actif

Isolat lactique	Substrat /Origine	Pathogène fongique	Toxine associée	Molécule antifongique	Référence
<i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> et <i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetyllactis</i>	Laboratoire de microbiologie appliquée, Université Oran1	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. redolens</i> and <i>F. solani</i>	NE*	NE	Zebboudj et al. (2020)
<i>Lact. plantarum</i>	Poisson (Dicentrarchus labrax)	<i>A. parasiticus</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. flavus</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>P. verrucosum</i>	NE	NE	Martí-Quijal et al. (2020)
<i>Lact. plantarum</i> et <i>Lact. coryniformis</i>	Riz	<i>A. flavus</i> et <i>A. fumigatus</i>	NE	Plusieurs composés	Anwer Bukhari et al. (2020)
<i>Lactobacillus</i> sp	Lait caillé (Rayeb)	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. carbonarius</i>	Aflatoxine B1, Ochratoxine A	Acide organique, pyroxyde d'hydrogène, 2-Méthyldecane (C11H24), Pentadecane (C15H32)	Shehata et al. (2019)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. paracasei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Laits caillés, produit fermenté (Amordj)	<i>Mucor recemosus</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Paecilomyces formosus</i> , <i>A. flavus</i>	NE	Acide acétique, acide lactique, autres acides, composés organiques	Ouiddir et al. (2019)
<i>Lact. helveticus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Plusieurs sources : plantes forestières, produits de la ferme	<i>A. Versicolor</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	NE	Acide lactique, acide citrique, acide benzoïque, acide sorbique, protéines, pyroxyde d'hydrogène, diacéthyle éthanol.	Salomskiene et al. (2019)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Blé fermenté (Lemzeiet)	<i>Rhodotorula muciliginosa</i> , <i>P. verrucosom</i> , <i>A. flavus</i>	NE	NE	Merabti et al. (2019)
<i>Lact. plantarum</i>	German collection of microorganisms and cells culture	<i>A. flavus</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>Fusarium avenaceum</i>	NE	NE	Zivkovic et al. (2019)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. paraplantarum</i> , <i>Ent. faecium</i>	Grains fermentés (Zgougou) de <i>Pinus halepensis</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i>	NE	Métabolites extracellulaires (NS**)	Missaoui et al. (2019)
<i>Lact. Sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Collection de Kaunas University of Technology,	<i>P. verrucosum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>F. poae</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. solani</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. expansum</i>	Deoxynivalénol Zearalenone T-2 HT-2	Composés organiques non acides	Juodikiene et al. (2018)
<i>Lact. Plantarum</i> <i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	Arachides, orange, farine	<i>A. flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Aflatoxines Ochratoxine A	Acide lactique, PLA	Kaktcham et al. (2018)

<i>Lact. Plantarum</i>	Lait	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. minisclerotigenes</i>	Aflatoxines	Acide lactique, acide phenyllactique (PLA), acide hydrophenyllactique (OH-PLA), acide indole lactique (ILA)	Guimaraes et al (2018a)
<i>Lact. Plantarum</i>	Lait	<i>P. nordicum</i>	Ochratoxine A	Acide lactique, acide phenyllactique (PLA), acide hydrophenyllactique (OH-PLA), acide indole lactique (ILA)	Guimaraes et al (2018b)
<i>Lact. Buchneri</i>	Ensilage			Acide acetique, acide lactique, PLA	
<i>Lact. Plantarum</i> , <i>Lact. Paralimentarius</i> , <i>Lact. rossiae</i> , <i>Lact. curvatus</i> , <i>Lact. brevis</i> , <i>Lact. paraplantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuc. pseudo-mesenteroides</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	Levain	<i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i>	NE	NE	Demirbas et al. (2017)
<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lact. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Grenadier (<i>Punica granatum</i>)	<i>A. flavus</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigates</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> , <i>Penicillium. sp. et phomopsis varsoniana</i>	NE	NE	Gajbhiye et Kapadnis (2017)
<i>Lact. rhamnosus</i> , <i>Lact. johnsoni</i> , <i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. delbrueckii bulgaricus</i>	CECT Valencia, Espagne	<i>A. parasiticus</i> , <i>P. expansum</i>	NE	Peptides	Luz et al. (2017)
<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>Lact. adolescentis</i> , <i>Lact. rhamnosus</i> , <i>Lact. ruminis</i> , <i>Lact. casei</i> , <i>Lact. johnsoni</i> , <i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. reuteri</i> , <i>Lact. bulgaricus</i> , <i>Lact. paracasei</i> , <i>Lact. Salivarius</i>	CECT Valencia, Espagne	<i>A. parasiticus</i> et <i>P. expansum</i>	Aflatoxines	NE	Saladino et al. (2016)
<i>Lact. plantarum</i>	Tempeh	<i>A. flavus</i> , <i>P. roqueforti</i> et <i>Eurotium rubrum</i>	NE	Peptides	Muhialdin et al. (2016)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. brevis</i>	University College Cork, Ireland	<i>F. culmorum</i>	NE	Acides organiques et phenoliques	Peyer et al. (2016)
<i>Lact. delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i> , <i>Lact. brevis</i> , <i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. rhamnosus</i>	Gene Bank	<i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxine B1	NE	Prathivadi Bayankaram et Sellamuthu (2016)
<i>Lact. Plantarum</i>	Plusieurs sources	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Cladosporium</i> sp.	NE	PLA	Russo et al. (2016)
<i>Lact. amylovorus</i> , <i>Lact. reuteri</i>	Céréales Etre humain	<i>F. culmorum</i>	NE	Acides acétique, lactique, benzoïque et autres, PLA,	Oliveira et al. (2015a)

<i>Lact. amylovorus</i> , <i>Lact. reuteri</i>	Céréales Etre humain	<i>F. culmorum</i>	Deoxynivalenol	Acide phenyllactique (PLA)	Oliveira et al. (2015b)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. helveticus</i>	Blé, seigle	<i>A. niger</i> , <i>P. claviforme</i>	NE	NE	Sevgi et Tsveteslava (2015)
<i>Ln. mesenteroides</i>	Tempeh	<i>A. niger</i>	NE	Peptides	Muhalidin et al. (2015)
<i>Pediococcus sp.</i> , <i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. brevis</i> , <i>Lact. sanfranciscensis</i>	Noix de coco	<i>A. carbonarius</i> , <i>A.niger</i> et <i>A. ochraceus</i>	Ochrotoxine A	Peptides	Ngang et al. (2015)
<i>Lact. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Levains de seigle	<i>Fusarium spp. Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Alternaria spp</i>	NE	NE	Suproniene et al. (2015)
<i>Lact. plantarum</i>	Végétaux fermentés Koréans	<i>Ganoderma boninense</i>	NE	dipeptides Cyclique; cis-cyclo(L-Val-L-Pro) et cis-cyclo (L-Phe-L-Pro)	Kwak et al. (2014)
<i>Lact. plantarum</i>	Kimchi et aliment d'origine animale	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A.nidulans</i> , <i>C. gossypiicola</i> , <i>P. roqueforti</i>	NE	Acide 5-oxododecanoic, acide 3-hydroxy decanoic, et acide 3-hydroxy-5-dodecenoic	Ryu et al. (2014)
<i>Lact. plantarum</i>	NS	<i>A. niger</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>Mucor racemosus</i> et <i>P. chrysogenum</i>	NE	Peptides	Gupta et Srivastava (2014)
<i>Lact. casei</i>	NS	<i>P. chrysogenum</i>	NE	NE	Li et al. (2014)
<i>Lact. plantarum</i>	Kimchi Koréan	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. oxysporum</i>	NE	Protéines	Rather et al. (2013)
<i>Lact. sakei</i> , <i>Ped. acidilactici</i> , <i>Ped. pentosaceus</i>	Levains de seigle Lithuanien	<i>F. culmorum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus stolonifera</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>A. tereus</i> , <i>F. culmorum</i> et <i>F. solani</i>	NE	Acides organiques et substance bacteriocin-like	Cizeikiene et al. (2013)
<i>Lact. acidophilus</i> , <i>Lact. brevis</i> , <i>Lact. casei</i> , <i>Lact. paracasei</i> , <i>Lact. bulgaricus</i> , <i>Lact. fermentum</i> , <i>Lact. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Ent. Faecium</i> , <i>Ent. Mundtii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>St. Thermophilus</i> , <i>Lact. curvatus</i> , <i>Lact. reuteri</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lact. collinoides</i> , <i>Lact. coryniformis</i> , <i>Lact. mali</i> , <i>Weissella ascens</i> , <i>Lact. rhamnosus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Plusieurs sources	<i>A. niger</i> , <i>P. sp.</i> , <i>F.graminearum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>Geotrichum citriaurantii</i>	NE	Acide lactique et acétique, PLA, peptides	Gerez et al. (2013)
<i>Lact. brevis</i> , <i>L. lactis ssp. cremoris</i> , <i>L. lactis ssp. lactis</i> et <i>En. faecium</i>	Grenadier	<i>F. graminearum</i>	NE	NE	Gajbhiye et al. (2012)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>W. confusa</i> , <i>P.</i>	Plusieurs sources	<i>P. expansum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P.</i>	NE	Acide lactique, acide acétique, PLA	Crowley et al. (2012)

<i>pentosaceus</i> et <i>Lactococcus lactis</i>		<i>roqueforti</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>F. culmorum</i> et <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			
<i>Lact. Rhamnosus</i> , <i>Lact. fermentum</i> <i>W. cibaria</i> et <i>W. paramesenteroides</i>	Cire fermentée	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	AFB1	NE	Gerbaldo et al. (2012)
<i>Ln. citreum</i> et <i>W. confusa</i>	Produits à base de riz	<i>P. oxalicum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. sydowii</i> et <i>Mucor racemosus</i>	NE	Acides organiques	Lan et al. (2012)
<i>Ln. citreum</i> et <i>W. confusa</i>	Produits à base de riz	<i>Cladosporium sp.</i> , <i>Neurospora sp.</i> et <i>P. crustosum</i>	NE	Acide lactique et citrique	Baek et al. (2012)
<i>Lact. casei</i>	Fromage	<i>Penicillium sp.</i>	NE	Cyclo-(Leu-Pro), 2,6-diphenyl – piperidine et 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;10,20-d] pyrazine	Li et al. (2012)
<i>Lact. plantarum</i>	Koumiss (lait fermenté asiatique)	<i>Glomerella cingulate</i> , <i>Phytophthora drechsleri</i> Tucker, <i>P. citrinum</i> , <i>P. digitatum</i> et <i>F. oxysporum</i>	NE	3-phenyllactic acide et Benzeneacetic acid, 2-propenyl ester	Wang et al. (2012)
<i>Lact. plantarum</i>	Xinjiang koumiss	<i>B. cinerea</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Phytophthora drechsleri</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>Glomerella cingulata</i>	NE	Composés protéiques et autres composés non identifiés	Wang et al. (2011)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>W. cibaria</i> et <i>W. paramesenteroides</i>	Farine et manioc fermenté	<i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>P. crustosum</i>	NE	Acide 2-hydroxy-4-methylpentanoic, PLA et autres acides organiques	Ndagano et al. (2011)
<i>Lact. amylovorus</i>	Environnement des céréales	<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>P. expansum</i> et <i>P. roqueforti</i>	NE	Acides carboxyliques, nucléosides, sodium decanoate et cinq dipeptides cycliques	Ryan et al. (2011)
<i>Lact. fermentum</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> , <i>Lact. pentosus</i> , et <i>Lact. paracasei</i>	Produits fermentés Malysiens	<i>A. niger</i> et <i>A. oryzae</i> ND	NE	Composés protéiques	Muhialdin et al. (2011)
<i>Lact. plantarum</i> et <i>Lact. rossiae</i>	Levain	<i>P. roqueforti</i> , <i>P. polonicum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. albocoremium</i> , <i>P. chermesinum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>Eurotium herbarioum</i> , <i>Eu. rubrum</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. versicolor</i> et <i>P. bialowiezense</i>	NE	Peptides et acides organiques	Rizzello et al. (2011)
<i>Lact. reuteri</i>	Intestin porcine et murin	<i>Trichophyton tonsurans</i>	NE	Produits non protéiques	Guo et al. (2011)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. pentosus</i> , <i>Lact. paracasei</i>	Blé	<i>F. graminearum</i>	DON	NS	Franco et al. (2011)
<i>Lact. plantarum</i>	Kimchi	<i>A. flavus</i>	NE	cyclo(Leu-Leu)	Yang et Chang (2010)
<i>Lact. plantarum</i>	Produits laitiers	<i>C. tropicalis</i>	NE	Protéines	Smaoui et al. (2010)
<i>Lact. plantarum</i> , <i>Ln. pseudo-</i>	Plusieurs sources	<i>P. nordicum</i>	NE	Probiotiques	Schillinger et

<i>mesenteroides</i>					Villarreal (2010)
<i>Ped. pentosaceus</i> L006 ND	Mais	<i>F. verticillioides</i> et <i>F. proliferatum</i>	NE	NS	Dalie et al. (2010a)
<i>Lact. plantarum</i>	Ensilage	<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. camembertii</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>P. expansum</i>	NE	PLA	Prema et al. (2010)
<i>Lact. Plantarum</i> <i>Lact. casei</i> , <i>Lact. acidophilus</i> , <i>Lact. paracasei</i> , <i>Ped. pentosaceus</i>	Produits laitiers	<i>P. digitatum</i> et <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	NE	Acide lactique et acétique, PLA	Gerez et al. (2010)
<i>Lact. brevis</i> , <i>Weissella cibaria</i>	Orge	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> et <i>F. tricinctum</i>	NE	Acides organiques et composés protéiques	Mauch et al. (2010)
<i>Lact. fermentum</i> ssp. <i>cellobiosus</i> et <i>Lact. rhamnosus</i>	Excréments de poulet, lait de brebis	<i>A. nomius</i>	NE	NE	Muñoz et al. (2010)

*NE : non étudier

**NS : non spécifier

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

II.1 Première partie : Identification et caractérisation des moisissures des blés

La présente partie aborde, en des analyses physico-chimiques, mycologiques et mycotoxiques, le recensement, l'identification et la caractérisation morphologique, physiologique et toxicologique des différentes espèces fongiques susceptibles de contaminer les grains des blés durs et tendres locaux et importés. A ce titre, il faut noter que les résultats des examens fongiques n'ont de valeur que si certaines précautions d'échantillonnage sont respectées, notamment :

- la prise d'échantillons avec des instruments stériles ;
- la mise des échantillons dans des sachets en papier stériles ;
- le respect des règles d'hygiène générale par la personne effectuant le prélèvement ;
- l'acheminement des échantillons au laboratoire doit être rapide ; et
- les échantillons doivent être conservés dans un endroit frais et sec (8 à 15°C) mais jamais à des températures négatives.

II.1.1 Matériel biologique

Pour les analyses mycologiques, nous avons échantillonné soixante-quatre (64) échantillons de blés durant la période allant d'octobre 2012 à avril 2014. Tandis que pour les analyses mycotoxiques, nous avons prélevé trente cinq (35) échantillons de 1kg. Les informations respectives sont mentionnées dans le **tableau II.1**. Notons que les différents échantillons des blés tendres (*Triticum aestivum* L) locaux et importés, du blé dur (*Triticum durum* Desf) importé et ceux du blé dur local de Taghit et de Tabelbala, ont été prélevés au niveau de la Coopérative des Céréales et des Légumes Secs (CCLS) de Béchar.

Tableau II.1 : Données informatives sur les échantillons des blés.

Echantillon	Variété	Code	Type d'analyse	Nb	Provenance	Date de l'échantillonnage
Blé tendre importé	NM*	BTF	Mycologique	27	France	octobre 2012-février 2013
			Toxicologique	12		
Blé tendre local	HD	BTL	Mycologique	6	Taghit (30°54'57.15''N/2°01'47.43''W)	avril 2013
			Toxicologique	2		
Blé dur importé	NM	BDF	Mycologique	9	France	avril 2014
			Toxicologique	9		
Blé dur local	NM	BDL ₀	Mycologique	12	Oum Chegag. Lahmer (31°55'54.26''N/2°15'30.23''W)	avril 2013-juin 2013
			Toxicologique	10		
	Vitron	BDL ₁	Mycologique	5	Taghit (30°54'57.15''N/2°01'47.43''W)	Mars 2013-avril 2013
			Toxicologique	1		
	Vitron	BDL ₂	Mycologique	5	Tabelbala (29°24'25.29''N/3°15'25.65''W)	janvier 2013-mars 2013
			Toxicologique	1		
Total				99		

* Non mentionné

La méthode utilisée pour l'échantillonnage est celle décrite par le *Codex Alimentarius CAC/GL 50-2004*. Nous avons, d'abord, prélevé aléatoirement **n échantillons primaires** de taille similaire, puis nous avons formé l'**échantillon composite** en mélangeant soigneusement les échantillons primaires. Enfin, une fois au laboratoire, nous avons divisé ce dernier en **échantillons finaux** de 300g qui ont fait l'objet des différentes analyses.

II.1.2 Analyses chimiques des blés

II.1.2.1 Détermination du taux de la teneur en eau

C'est une méthode d'étuvage qui consiste à effectuer un séchage d'une prise d'essai de chaque échantillon à une température de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ après deux heures, puis, après chaque heure jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Multon, 1982**). Le taux de la teneur en eau est calculé par la formule suivante :

$$\text{TR \%} = \frac{(\text{P}_0 - \text{P}_t) - (\text{P}_1 - \text{P}_t)}{(\text{P}_0 - \text{P}_t)} \times 100$$

P_t : poids de la tare.

P_0 : poids de la tare avec échantillon.

P_1 : poids constant après séchage multiple.

II.1.2.2 Détermination du pH

Pour l'estimation de l'acidité ou de l'alcalinité des différents échantillons nous préparons une solution à base de 45ml d'eau distillée et de 5g d'échantillon broyé. Après agitation et repos d'une heure, la mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH mètre (**Multon, 1982**).

II.1.2.3 Analyses statistiques

Le teste du taux de l'humidité relative a été réalisé en triplicata. La moyenne et l'écart-type des trois valeurs ont été calculés par Excel.

II.1.3 Analyses mycologiques

II.1.3.1 Isolement et dénombrement de la flore fongique totale

La méthode utilisée pour l'isolement et le dénombrement des moisissures susceptibles de contaminer les différents échantillons de blés, est la « méthode de dilution ». Selon **Cahagnier (1998)** et **Pitt et Hocking (2009)**, l'intérêt de cette méthode réside dans le fait que les propagules fongiques sont isolées et dénombrées à partir de la même suspension mère qui intègre les flores internes et externes.

Pour ce faire, nous avons pris, au hasard, 5g de chaque échantillon (le grain doit être broyé) et nous l'avons mis dans 45ml d'eau physiologique stérile en ajoutant deux gouttes de Tween 80 (pour bien disperser les propagules fongiques) : c'est la dilution 10^{-1} ou suspension mère. De cette dilution, nous avons pris 1ml que nous avons ajouté à 9ml d'eau physiologique stérile : c'est la dilution 10^{-2} . A partir des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} , nous avons

ensemencé deux boîtes de Pétri de Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA) [milieu sélectif des *Fusarium*, *Alternaria*, *Drechslera* et *Curvularia*] et deux boîtes de Potato Dextrose Agar acidifié (PDA_{ac}) [l'acidité du milieu permet d'éviter la croissance bactérienne] avec 1ml d'inoculum étalé en surface. Après 10 à 15mn de repos, nous avons éliminé le surnageant et incubé les boîtes de Pétri à 25°C pendant 5 à 7 jours. Après le temps d'incubation, nous avons procédé au dénombrement des différentes colonies fongiques en nous basant sur la couleur et l'aspect de ces dernières et de leur revers.

II.1.3.2 Analyses statistiques

L'isolement et le dénombrement de la flore fongique contaminant les différents échantillons des blés, ont été réalisés en duplicata. Les résultats calculés par Excel, seront donnés en moyenne plus ou moins (\pm) l'écart-type.

II.1.3.3 Purification et conservation des isolats

Les isolats purs ont été conservés en solution sporale dans des eppendorfs contenant le milieu Potato Dextrose Broth (PDB) à 30% de glycérol et en tubes inclinés de PDA_{ac} à 4°C. Nous notons que la purification a été effectuée en ensemençant quelques spores d'une colonie fongique au centre d'une boîte de Pétri contenant le PDA.

II.1.3.4 Caractérisation morphologique

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères culturels ou critères macroscopiques (texture et couleur du thalle, couleur du revers de la culture, odeur, exsudat et présence d'un pigment diffusible). Ils nous permettent de connaître l'espèce ; et à la morphologie microscopique qui nous permet d'identifier le genre des différents isolats fongiques (**Botton et al., 1990 ; Pitt et Hocking, 2009**).

▪ Identification du genre

La technique utilisée est celle décrite par **Haris (1989)**. Il s'agit de la « technique de micro-culture ». Elle consiste à inoculer les spores de chaque isolat fongique sur des lames menées de petits carrés/cercles gélosés de PDA_{ac} ou de Spezieller Nährstoffarme Agar (SNA). Ces derniers sont ensuite couverts par des lamelles. Nous notons qu'il est essentiel d'ensemencer les spores sur les limites périphériques de la pastille gélosée pour leur fournir, ainsi, un potentiel d'oxygène assez élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble, (lame et lamelle), est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubée à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après la période d'incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant une goutte de lactophénol et observées au microscope, aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ avec l'huile d'émersion. Les genres sont déterminés par les caractères culturels et microscopiques en se référant au manuel de **Botton et al. (1990)**.

Il est à noter que les caractéristiques microscopiques à observer sont, selon **Djessou (2011)** :

- ➔ un mycélium septé/cloisonné ou non,
- ➔ la nature du conidiophore (pinceau ou tête aspergillaire),
- ➔ les cellules conidiogènes (bisériée ou unisériée),
- ➔ une ornementation de la paroi des spores (verruqueux, échinulé, lisse, granuleux),
- ➔ la taille et la forme des spores et conidies, et
- ➔ la présence ou l'absence de zygosporé.

En plus des caractéristiques citées ci-dessus, les espèces fusariennes requièrent d'autres aspects à étudier, notamment :

- ➔ l'épaisseur de la paroi des macroconidies,
- ➔ la forme des macro-conidies, notamment leur incurvation, que les faces dorsales et ventrales aient la même incurvation ou non,
- ➔ la forme de la cellule apicale et de la cellule basale,
- ➔ la présence ou l'absence des micro-conidies,
- ➔ les microconidies en chaînes ou en « fausse tête »,
- ➔ la forme des microconidies (ovales, en aiguille, citriformes, piriformes, fusiforme, etc),
- ➔ le type de conidiophores (structures de production des microconidies) : monophialides ou polyphialides, et
- ➔ la présence ou l'absence de chlamydo-spores et disposition (isolées, par deux, en chaînes, intercalaires ou terminales, etc).

▪ **Identification de l'espèce**

La systématique des champignons est basée principalement sur des critères morphologiques. En pratique, la procédure la plus utilisée est la croissance d'isolats sur un milieu de culture approprié, ce qui permet de reconnaître les traits caractéristiques de ces isolats qui sont génétiquement stables et en général peu influencés par les changements environnementaux (**Verscheure et al., 2002**). Cet examen permet de déterminer la vitesse de croissance, l'aspect et la couleur du thalle, la couleur de la partie de la colonie en contact avec le milieu (revers) et éventuellement la coloration du milieu de culture (éventuelle présence d'exsudats), le diamètre des colonies et la présence et la couleur des sporodochies [structures de production des macro-conidies] (**Dendouga, 2010 ; Le Plat, 2012**).

L'identification des espèces a été réalisée par la méthode « single spore » décrite par **Pitt et Hocking (2009)**, avec quelques modifications. Pour ce faire, nous avons, d'abord, préparé une suspension de conidies/spores dans 10ml d'eau distillée stérile ; 2ml de cette suspension ont été versés dans des boîtes de Pétri contenant une gélose à 2% d'agar et incubée à 25°C±2 pendant 18 à 20h. Après la durée d'incubation, les boîtes ont été examinées sous une loupe binoculaire en lumière transmise sous grossissement ×25 pour viser les conidies en germination. Enfin, à l'aide d'une aiguille à dissection dotée d'une extrémité aplatie et des bords aiguisés, nous avons découpé un petit carré de gélose (4 à 6mm)

contenant une seule conidie en germination qui sera déposée sur différents milieux selon ce qui suit (**Figure II.1**) :

- Malt Extract Agar (MEA) à 25°C,
- Glycérol Nitrate Agar (G25N) à 25°C,
- Potato Dextrose Agar acidifié (PDA) à 25°C,
- Czapek Yeast Agar enrichi (CYA) à trois températures différentes : 5°C, 25°C et 37°C,
- Dichloran Chloramphénicol Malt Extract Agar (DCMA) à 25°C (spécifique aux *Alternaria*),
- Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar (DCPA) à 25°C (spécifique aux *Fusarium*), et
- Aspergillus Flavus Parasiticus Agar (AFPA) à 25°C (spécifique aux *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*).

La lecture a été faite après 7 et 14jrs en se référant aux clefs d'identification de **Pitt et Hocking (2009)**, de **Botton et al. (1990)** et aux descriptions de **Leslie et Sumerrell (2006)** pour les *Fusarium*.

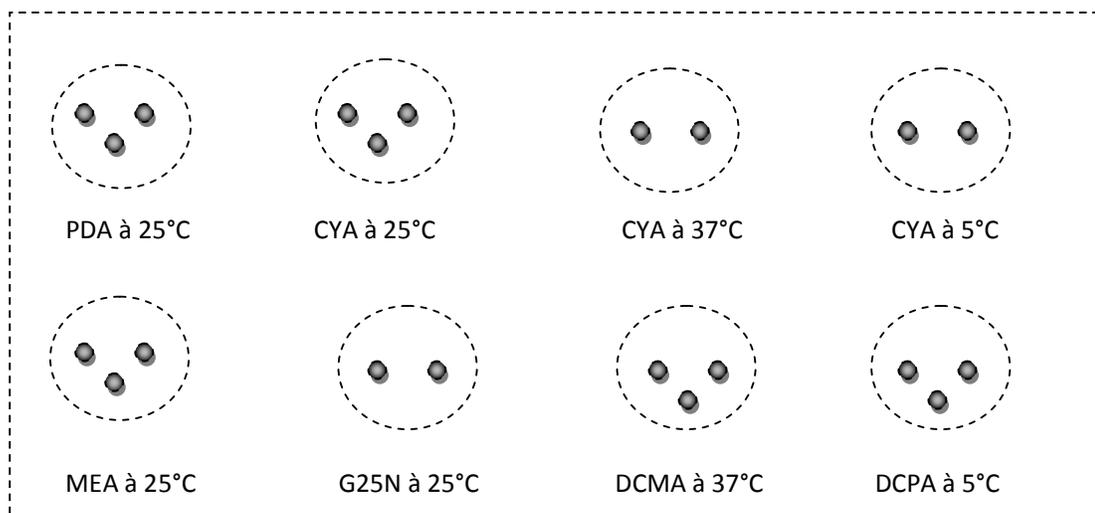


Figure II.1 : Mode d'inoculation des milieux de culture par les différents isolats fongiques.

II.1.3.5 Caractérisation physiologique

Les paramètres physiologiques étudiés sur milieu PDA, sont la température, le pH, les concentrations en NaCl et l' A_w . La caractérisation physiologique a concerné six souches de l'espèce *F. graminearum*. Cette caractérisation a été réalisée dans le but de déterminer :

- l'effet des différents paramètres sur la croissance de *F. graminearum* ;
- le taux de croissance mycélienne selon différentes valeurs des principaux facteurs de croissance ;
- la valeur ou l'intervalle des valeurs optimales de la croissance de *F. graminearum* ; et

- la valeur ou l'intervalle des valeurs maximales et minimales de la croissance de *F. graminearum*.

- **Effet des températures**

Le protocole en milieu gélosé est le suivant (**Pitt et Hocking, 2009**) :

- couler le milieu PDA_{ac} (1ml d'acide lactique dans 200ml de PDA) dans des boites de Pétri et laisser se solidifier ;
- ensemercer le centre de chaque boite par un une pastille gélosée de 4 à 6mm de diamètre contenant une conidie en germination (selon la technique Single Sporing décrite ci-dessus) ;
- incuber les boites à différentes températures : 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C et 45°C à l'obscurité pendant 14jrs.

- **Effet du pH**

Le même protocole décrit dans la section précédente a été effectué, mais à différentes valeurs de pH : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 (**Wheeler et al., 1991**). Les boites de Pétri ont été incubées à 25°C à l'obscurité pendant 14jrs.

- **Effet de l'A_w**

L'étude de l'effet de l'activité de l'eau a été réalisée selon le protocole expérimental établi par **Sempere et Santamarina (2010)**. Le milieu gélosé PDA a été préparé à différentes activités d'eau (0.995, 0.98 et 0.95 : 2.5, 11 et 23.5 g de glycérol/100ml du milieu). Après la solidification du milieu, les boites ont été ensemençées par un petit carré gélosé de 4 à 6mm de diamètre contenant une conidie en germination de *F. graminearum* (selon la technique Single Sporing : **voir la section identification des espèces**) et incubées à 25°C à l'obscurité pendant 14jrs.

- **Effet de NaCl**

Les différentes concentrations en NaCl étudiées sont 1%, 5% et 10%. Le protocole réalisé est le même que celui utilisé pour les tests physiologiques précédents (**Pitt et Hocking, 2009**).

- **Expression des résultats**

Le diamètre (dans les deux sens perpendiculaires) des colonies a été mesuré tous les deux jours jusqu'à l'arrêt total de la croissance.

II.1.3.6 Caractérisation mycotoxicologique

II.1.3.6.1 Recherche des *F. graminearum* Chemotype DON

L'identification du pouvoir toxigène a été effectuée uniquement pour les souches appartenant à l'espèce *F. graminearum* qui sont, potentiellement, susceptibles de produire du DON. Le présent test a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM). Ceci après une culture des souches fongiques pendant 10 à 15jrs, qui sera suivie d'une extraction par un solvant organique adéquat et une purification sur colonne d'immuno-affinité (Puri-Fast DON IAC de marque tecnalab).

▪ Culture des souches fongiques

Les isolats fongiques ont été cultivés dans des boîtes de Pétri en verre contenant le milieu Glucose Yeast Extract Pepton (GYEP). La technique utilisée est celle proposée par **Boutigny** en **2007**. Elle consiste en de mini-cultures statiques qui se réalisent comme suit :

- ➔ mettre 15ml du milieu GYEP dans des boîtes de Pétri en verre de 55mm de diamètre ;
- ➔ inoculer avec 1ml de 10^4 spores/ml ;
- ➔ incuber à 25°C pendant 10 à 15 jrs.

La technique des mini-cultures statiques nous permet, non seulement, d'économiser les solvants qui sont chers mais également le temps (10 à 15 jours contre 21 jours en cultures classique). Tout comme, de réaliser ce test en triplicata et donc de confirmer ou d'infirmer la toxicité de nos isolats.

▪ Extraction des toxines

L'extraction a été faite par l'acétonitrile visant ainsi, le déoxynivalénol comme suit :

- ➔ à 4ml de milieu de culture, ajouter 8ml d'acétonitrile ;
- ➔ agiter vigoureusement pdt 10 à 15mn ;
- ➔ laisser décanter.

▪ Purification des extraits du DON

Selon plusieurs auteurs notamment, **Balzer (2003)** et **Tabuc (2007)**, la détection du déoxynivalénol par les techniques chromatographiques nécessite une purification de cette molécule sur colonnes. Ceci, nous permettra de séparer les molécules DON des autres molécules dérivées (3-ADON et 15-ADON) qui sont généralement présentes en fortes concentrations. Le mode opératoire, est le suivant :

- ➔ laisser les extraits et les colonnes à température ambiante pendant 15mn ;
- ➔ diluer l'extrait de sorte que le solvant ne dépasse pas 10% ;
- ➔ enlever le bouchon supérieur et inférieur et attacher l'adaptateur à la colonne ;
- ➔ attacher la seringue à l'adaptateur et mettre l'extrait (dilué, filtré et homogénéisé) ;

- ➔ après élution de l'extrait à raison de 1ml/mn, rincer la colonne avec 10ml de solution de rinçage (1:10 / v:v) en deux fois à raison de 1 à 3ml/mn ;
- ➔ à l'aide d'une seringue, appliquer une pression afin d'évacuer tout le solvant restant ;
- ➔ fermer la colonne avec le bouchon inférieur ;
- ➔ mettre la colonne dans un tube à hémolyse et mettre 3ml de méthanol (éluant à 100%) dans la colonne ;
- ➔ laisser les molécules DON se dénaturer pendant 2mn ; puis,
- ➔ retirer le bouchon pour permettre l'élution du méthanol ;
- ➔ conserver les extraits purs à -20°C jusqu'au jour de leur dosage par CCM.

▪ Réalisation de la plaque CCM

Plusieurs auteurs ont recommandé une élution de la molécule. Cependant, étant donné que la toxine a été préalablement purifiée, nous suggérons, en nous appuyant sur plusieurs tests effectués, qu'il est plus correct de faire une révélation sans l'élution ; ceci en mettant sur la même plaque 50µl de chaque échantillon et du standard DON, nous permettant ainsi d'avoir une idée primaire sur la quantité en DON produit par chaque souche. Notons que la Chromatographie sur Couche Mince est une technique qualitative.

Les molécules DON n'étant pas fluorescentes, elles ont, donc, besoin d'une révélation chimique par le chlorure d'aluminium, l'oxyde d'alumine ou l'acide sulfurique ou encore le para-anisaldéhyde (**Balzer, 2003**). Cette révélation induira une réaction colorée (couleur bleue) qui nous permettra un examen visuel ou fluorométrique ou encore sous UV. Il faut également un chauffage à 120°C pendant 7 à 10mn.

II.1.3.6.2 Recherche du DON au niveau du substrat

Cette étape a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM) après une extraction par un solvant organique adéquat et une purification sur colonne d'immuno-affinité (Puri-Fast DON IAC de marque tecnalab) ; et également, par ELISA (Celer DON V₃ de marque tecnalab).

▪ Dosage du DON par CCM

L'extraction du déoxynivalénol a été effectuée selon le protocole décrit par **Tabuc en 2007**, comme suit :

- ➔ broyer finement, 50g de grains de blé ;
- ➔ mélanger les 50g de blé avec 200ml d'acétonitrile : eau distillée + 4% de NaCl (84 :16 v/v) ;
- ➔ agiter fortement le mélange pendant 120mn (2h) ;
- ➔ filtrer le mélange sur papier Whatman N°1.

Chaque extrait a été purifié et dosé par CCM selon le protocole décrit plus haut (**voir la section II.1.3.7.1 : purification des extraits du DON et réalisation de la plaque CCM**).

▪ Dosage du DON par ELISA quantitative

L'extraction du déoxynivalénol à partir des grains de blé tendre (*Triticum aestivum L*) diffère de celle à partir des grains de blé dur (*Triticum durum Desf*). Dans le cas des grains de blé dur, il faut mélanger 50g de grains broyés avec 250ml d'eau distillée ; après une agitation manuelle vigoureuse pendant 15mn et la stabilité du mélange, ce dernier a été filtré. Le filtrat a été, ensuite, dilué dans le méthanol pur à raison de 1:3 (v/v) et prêt pour le dosage par ELISA de 0.12 à 15ppm. Pour ce qui est du blé tendre, nous avons mélangé 10g de grains broyés avec un mélange de 35ml de méthanol à 70% et 15ml d'eau distillée + 4% de NaCl. De même, après une vigoureuse agitation pendant 3 à 10mn et la filtration du mélange, l'extrait est prêt pour le dosage par ELISA de 0.04 à 5ppm. Notons que les 35 extraits ont été conservés à -20°C jusqu'au jour du dosage.

Le dosage des différents extraits de blé tendre et de blé dur a été réalisé comme suit :

- ✦ mettre 100µl de l'enzyme de conjugaison (enzyme conjugate) dans chaque puits de pré-mélange ;
- ✦ ajouter 50µl de l'extrait du standard (0ppm, 0.04ppm, 0.25ppm, 1.25ppm et 5ppm) /échantillon, (avant d'utiliser l'embout, il est recommandé de le rincer de haut en bas avec du méthanol) ;
- ✦ transférer immédiatement 100µl du mélange dans les puits anti-DON/anticorps correspondants (il faut un embout pour chaque puits) ;
- ✦ incuber 10mn à température ambiante, (il faut couvrir les puits, ne pas les secouer et ne pas prolonger le temps d'incubation) ;
- ✦ après incubation, verser le liquide hors des puits ;
- ✦ remplir les puits complètement avec la solution de rinçage (1/10) ;
- ✦ verser le contenu immédiatement et refaire le rinçage à raison de trois fois ;
- ✦ enlever le liquide restant en tapant la microplaque vigoureusement sur du papier absorbant ;
- ✦ pour le développement, mettre 100µl de la solution du développement et mixer vigoureusement par des mouvements rotatoires pendant quelques secondes ;
- ✦ incuber 10mn à température ambiante, (il faut couvrir les puits, ne pas les secouer et ne pas prolonger le temps d'incubation) ;
- ✦ mettre 50µl de la solution Stop et mixer vigoureusement par des mouvements rotatoires quelques secondes ;
- ✦ mesurer l'absorbance à 450nm, (il faut faire la lecture durant les 60mn).

Il est à noter que la technique ELISA est très rapide, elle dure uniquement 20mn.

II.2 Seconde partie : Biocontrôle de *Fusarium graminearum*

La seconde partie de notre travail a été réalisé dans le but de rechercher des alternatives naturelles de lutte contre les champignons phytopathogènes, entre autres, par la lutte biologique. Nous étudions, dans un premier volet, les interactions entre diverses espèces

fongiques appartenant à différents genres. Dans un second volet, nous évaluons l'effet antifongique des bactéries lactiques autochtones des mêmes blés échantillonnés.

II.2.1 Etude des interactions entre les espèces fongiques

La présente étude est réservée au biocontrôle *in vitro* de *F. graminearum* par l'étude de leur interaction sur PDA_{ac}, avec plusieurs autres espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. niger*), *Penicillium* (*P. janthinellum*) et *Cladosporium* (*C. cladosporoides* et *C. herbarum*). Notons que les différents agents pathogènes et antagonistes ont été isolés des mêmes biotopes au cours de la même période. Les essais ont été effectués en adoptant trois techniques : confrontation par contact direct, confrontation par contact direct à distance de temps et confrontation par contact direct à distance d'espace.

II.2.1.1 Confrontation par contact direct

Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri deux pastilles gélosées de 4 à 6mm, l'une portant l'agent pathogène pur et l'autre l'agent antagoniste pur. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral de 3cm et à équidistance du centre de la boîte. Les repiquages ont été effectués en même temps (Benhamou et Chet, 1996). Les boites inoculées ont été incubées à 25°C pendant sept (07) jours. Des notations de l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies du pathogène et des agents antagonistes ont été effectuées après sept jours dans les deux sens perpendiculaires. Le témoin est constitué par un repiquage du pathogène seulement au centre de la boîte de Pétri. La **figure II.2** schématise cette première technique.

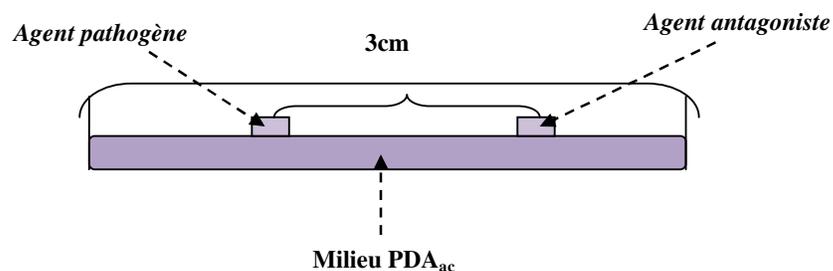


Figure II.2 : Confrontation par contact direct sur milieu de culture gélosé (Hibar et al., 2005).

II.2.1.2 Confrontation par contact direct à distance de temps

Cette expérience consiste en l'étude d'une éventuelle inhibition de l'agent pathogène par contact direct à distance de temps et ceci en prenant en considération le facteur vitesse de croissance des isolats des différentes espèces du pathogène et de celles de l'antagoniste (Hibar et al., 2005). Pour ce faire, nous avons suivi les mêmes étapes que la première technique (voir la section II.2.1.1 et la Figure II.3), mais à distance de temps comme suit :

- ➔ dans deux boîtes de Pétri, mettre, séparément, une pastille gélosée de chaque espèce, (agent pathogène ou agent antagoniste), suivant un axe diamétral de 3cm en préservant la place de l'autre espèce, (agent pathogène ou agent antagoniste), vide ;
- ➔ incuber à 25°C pendant 72 heures ;
- ➔ après 72h, mettre la pastille gélosée de l'autre espèce fongique dans la place vide et incubé de nouveau à 25°C pendant 7 jours.

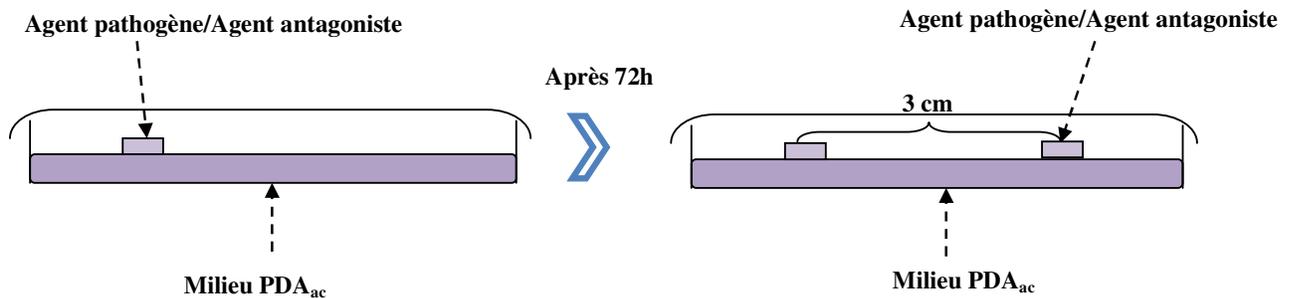


Figure II.3 : Confrontation par contact direct à distance de temps (Hibar *et al.*, 2005).

II.2.1.3 Confrontation par contact direct à distance d'espace

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage a été réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et le pathogène en haut (Figure II.4). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001). Notons que les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu gélosé.

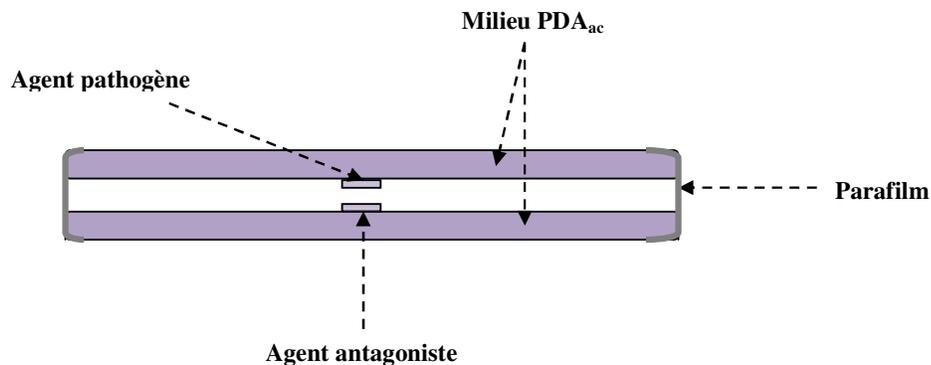


Figure II.4 : Confrontation par contact direct à distance d'espace (Hibar *et al.*, 2005).

II.2.1.4 Taux d'inhibition

L'évaluation de l'inhibition exercée par l'agent antagoniste sur l'agent pathogène a été estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996) :

$$I (\%) = [1 - (C_n/C_o)] \times 100$$

C_n : diamètre moyen des colonies du pathogène en présence de l'antagoniste ;

C_o : diamètre moyen des colonies pathogènes témoins.

II.2.2 Activité antifongique des bactéries lactiques

II.2.2.1 Isolement des bactéries lactiques

La technique d'isolement est celle faite par enrichissement. Elle a été proposée par **Chen et al.** en **2005** et modifiée par **Dalié et al.** en **2012**. Elle consiste à mettre 1g de grains de blé non broyés, de chaque échantillon, dans des tubes à essai contenant 5ml de MRS bouillon. Les tubes ont été, ensuite, incubés en anaérobiose à 30°C. Après 72h d'incubation, une série de dilutions décimales a été effectuée dans 9ml d'eau peptonée stérile, ceci jusqu'à une concentration de 10^{-8} . 100µl, de chaque dilution, ont été prélevés et ensemencés en surface des boîtes de pétri contenant du milieu MRS Agar. Les boîtes ont été incubées à 30°C durant 48 à 72 heures.

II.2.2.2 Purification des isolats lactiques

Dix pourcent (10%) des colonies de chaque boîte ont été prises, aléatoirement, et repiquées sur MRS bouillon et incubées à 30°C. Après 18h d'incubation, nous avons ensemencé les colonies en surface sur gélose MRS selon la technique des quadrants.

II.2.2.3 Conservation des isolats lactiques

Les isolats purifiés ont été conservés à long terme afin de stopper leur développement tout en permettant leur revivification. Elles ont été, d'abord, cultivées dans MRS bouillon pendant 18 à 48h afin d'obtenir de jeunes cultures. Ensuite, pour chaque souche, 1ml de culture fraîche a été transféré stérilement dans des tubes Eppendorfs, additionné de 500µl de glycérol stérile puis conservé à -20°C (**Boudra et Niderkorn, 2004**).

II.2.2.4 Revivification des souches lactiques

Elle se fait dans 5ml du bouillon MRS. Chaque tube est ensemencé avec 300µl de suspension bactérienne et incubé en anaérobiose à 30°C pendant 18 à 20h voire 24 à 48h. Nous notons qu'un ensemencement en stries sur gélose MRS, (en anaérobiose pendant 48 à 72heures à 30°C), est nécessaire avant chaque test afin de confirmer la pureté des isolats lactiques.

II.2.2.5 Caractérisation morphologique

- **Examen macroscopique**

Il consiste à relever la taille, la forme, le contour et la couleur des colonies des cultures bactériennes. Des ensemencements ont été réalisés sur plusieurs milieux de culture sélectifs notamment MRS, M17, BHI, Slanetz et CATC afin d'identifier le genre des souches lactiques sélectionnées et étudiées. Chaque milieu a été ensemencé par une colonie jeune de bactérie lactique et incubé pendant 24 heures à 30°C. Au bout de 15h, les colonies de

Streptocoques lactose-positives sont déjà visibles sur M17 et Slanetz ; tandis que les entérocoques sont observables sur milieu CATC et BHI.

- **Examen microscopique**

Il permet de décrire la forme des cellules (bâtonnets ou coques) et leur mode d'association. L'observation microscopique des cellules a été réalisée avec l'objectif à immersion ($\times 100$). Après l'examen des colonies à l'œil nu sur différents milieu gélosé, les souches lactiques ont été soumises à la coloration de Gram qui présente un double intérêt : elle permet à la fois d'observer la morphologie bactérienne (forme, taille, mode de regroupement...) et de mettre en évidence les propriétés de la paroi (Gram+ ou Gram-).

II.2.2.6 Caractérisation physiologique

- **Croissance à différentes températures**

Après inoculation du Bouillon MRS par les cultures jeunes des souches lactiques sélectionnées, les tubes ont été incubés pendant 24 à 48h aux températures 10°C, 30°C, 37°C, 45°C et 55°C. La croissance bactérienne est appréciée par examen des milieux. Notons que les bactéries mésophiles poussent à 10°C, alors que les bactéries thermophiles ne le font pas (**Idoui, 2009**).

- **Etude de la thermorésistance**

Des tubes MRS Bouillon ont étéensemencés par une culture jeune de 18 à 20h exposés à un chauffage à 63°C pendant 30mn ; par la suite, ils ont été incubés à 30°C pendant 24 à 48h. Les isolats qui ont poussé après ce traitement sont considérés comme thermorésistants (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

- **Croissance à différentes concentrations de NaCl**

Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4.5%, 6.5% et à 9% de NaCl. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h. L'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble (**Guiraud, 1998**).

- **Croissance à différents pH**

La croissance de la souche lactique a été étudiée à trois valeurs de pH 4.4, 6.5 et 9.6. Pour ce faire, 5ml de milieu MRS bouillon à différents pH ont été inoculés avec une culture jeune. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48h. Après incubation, la croissance bactérienne a été déterminée par l'apparition d'un trouble (**Guiraud, 1998**).

II.2.2.7 Caractérisation biochimique

- **Recherche de la catalase**

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant

sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester. Ceci reflète des bactéries à catalase positive (**Adnan et Tan, 2007**).

- **Détermination du type fermentaire**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé. Il consiste à mettre en évidence le dégagement de gaz carbonique (CO₂). C'est ainsi que nous pouvons classer les bactéries lactiques en homo ou en hétéro-fermentaires. Les souches ont été cultivées dans des tubes contenant du bouillon MRS avec une cloche de Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Kihal et al., 1996 ; Hariri et al., 2009**). Les souches homo-fermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 1% de CO₂; pendant que les souches hétéro-fermentaires, quant à elles, vont produire de l'acide lactique et du CO₂ à proportion égale, ce qui va être mis en évidence par la cloche de Durham qui se remplit de gaz (**Carr et al., 2002**).

Ce test a été confirmé par un second test. Les souches ont été cultivées dans des tubes contenant du bouillon MRS et la gélose blanche ; le développement d'une bactérie homo-fermentaire ne provoque pas la discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétéro-fermentaire pousse, au contraire, le bouchon gélosé vers le haut du tube (**Boussouar, 2016**).

- **Hydrolyse de l'esculine**

L'hydrolyse de cet hétéroside est mise en évidence sur le milieu bouillon à l'esculine. Il a été inoculé par une culture de 24h et incubé à 30°C pendant 24 à 48h. Une réaction positive se traduit par un noircissement du milieu dû aux sels ferriques solubles et l'esculétine. Pour les bactéries négatives, le milieu reste inchangé bien qu'il y a une croissance bactérienne (**Belarbi, 2011**).

- **Utilisation du citrate**

L'utilisation du citrate est détectée sur le milieu **Kempler et Mc Kay (1980)** après incubation à 30°C pendant 24 à 48h. Les colonies qui fermentent le citrate sont des colonies bleues ou ayant un centre bleu (Citr +). En revanche, les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Citr -) (**Belarbi, 2011**). Le milieu Citrate de Simmons coulé en tube incliné a été aussi utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes. Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de Bromothymol ; ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide. Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu (**Boussouar, 2016**).

- **Utilisation de mannitol et test de mobilité**

Ce test permet l'étude de la dégradation du mannitol et la recherche de la mobilité des bactéries. L'ensemencement a été effectué par piqure centrale en utilisant le milieu mannitol mobilité semi-solide. Le tube est ensuite incubé à 37°C pendant 24 à 48h (**Boussouar, 2016**).

- **Croissance sur lait de Sherman**

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence du bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant et incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 à 48h. Les lactocoques réduisent le bleu de méthylène avec coagulation ; en revanche, les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant. Ce test porte toujours sur le système respiratoire des lactocoques, car vu que ce sont des microaerophiles, ils ne vont utiliser qu'une faible partie de l'oxygène présent dans le bleu de méthylène (3%). De ce fait, la couleur du lait (bleu) ne virera que légèrement vers le blanc et ce, contrairement aux entérocoques (aérobies) qui utilisent la totalité de l'oxygène de bleu de méthylène (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990**).

- **Production de Dextrane**

Ce test est effectué pour les isolats du genre *Leuconostoc*. Les souches à tester ont été ensemencées sur la gélose MSE (**Mayeux et al., 1962**) et incubées à 30°C pendant 48h. Les colonies deviennent muqueuses brillantes donnant une pellicule opaque à la surface de la gélose (**Belarbi, 2011**).

- **Production d'Acétoïne**

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) après une culture de 24h à 30°C sur milieu Clark et Lubs (**Harrigan et Mccance, 1976 ; Zourari et al., 1991 ; Facklam et Elliot, 1995**). Ceci, en ajoutant 5 gouttes du réactif VP1, (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée), et le même volume du réactif VP2, (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 95°). Notons qu'il faut agiter soigneusement tout en laissant les tubes ouverts pour permettre une bonne oxygénation. Après un temps maximal de 10mn, la présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

- **Hydrolyse de l'arginine (ADH)**

Elle est mise en évidence sur le milieu de Moëller ADH (**Moëller, 1955 ; Harrigan et Mccance, 1976**). Nous avons ensemencé 50µl de solution bactérienne, (de chaque souche lactique), dans un mini puits de plaque Elisa contenant 200µl de bouillon Moëller arginine, (plus un témoin : Moëller sans arginine). Chaque puits doit être recouvert avec 4 à 5mm d'huile de paraffine stérile. Après 2 à 6jrs d'incubation à 30°C, la culture dans le puits témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu, (métabolisme du glucose),

(Larpen-Gourgaud *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 2002). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par une alcalinisation du milieu qui devient violet.

- **Fermentation des hydrates de carbones**

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers substrats carbonés en particulier les sucres. Ce test a été réalisé en tubes eppendorf contenant le bouillon MRS sans extrait de viande et sans sucre (MRSc-ev) et additionné du pourpre de bromocrésol à raison de 0.05g/l comme indicateur de pH (Leveau *et al.*, 1991). Notons que le glucose du milieu MRS est remplacé par l'hydrate de carbone à tester. Les solutions de sucres notamment mannitol, dextrine, raffinose, xylose, mannose, galactose, levulose, inositol, rhamnose, glucose, lactose, saccharose, arabinose, sorbose, adonitol, glycerol, maltose, sorbitol, cellobiose et amidon ont été stérilisées par tyndallisation puis introduit dans le milieu avec une concentration finale de 3%.

Une culture de 18h de la souche appropriée a été centrifugée à 8000 tr/mn pendant 15mn. Le culot récupéré a été additionné de 2ml de tampon phosphate puis, recentrifugé aux mêmes conditions pour le débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur. Cette étape a été réalisée en duplicata. Au culot, 1,5ml de milieu MRSBCM-EV a été additionnée pour fournir la solution cellulaire servant à ensemercer les tubes eppendorfs contenant différentes sources de carbone. La lecture des résultats se fait après 24 et 48h d'incubation (Guessas, 2007). Notons que nous avons prolongé la durée d'incubation pendant 5 à 7jrs pour voir s'il n'y a pas une éventuelle fermentation tardive d'un ou de plusieurs sucres.

Le présent test a été confirmé en utilisant les galeries API50 CHL (Biomérieux, REF 50, France). Les galeries API50 CHL permettent une identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce et même parfois de la sous espèce sur la base de la fermentation de 49 sucres différents. Le premier micro-tube sans principe actif, sert de témoin négatif. Le protocole de sa réalisation est le suivant :

1. L'inoculum primaire a été préparé en repiquant les souches lactiques sur MRS bouillon et agar. Elles ont été ensuite, incubées à 30°C pendant 24h et à 37°C en anaérobiose. Ceci dans le but de vérifier leur pureté et l'absence d'une éventuelle contamination. Après le temps d'incubation, chaque tube a été centrifugé à 4000 tr/min pendant 10min à 4°C ; le culot ainsi récupéré, a été additionné à 2ml de milieu API 50 CHL.
2. L'inoculum définitif a été préparé en deux séries de tubes à essai contenant 5ml du milieu API 50 CHL. Les étapes sont les suivantes :
 - à partir des tubes de 2ml contenant le milieu API 50 CHL, nous prélevons **n** gouttes et nous les transférons dans des tubes de 5ml de milieu d'API 50 CHL (1^{ère} série) jusqu'à obtention d'une densité DO : 0.45 (=2 Mc Farland) ;
 - à partir des tubes de 5ml de la première série, nous prélevons 2n, (**n** : nombre des gouttes initiales), et nous les transférons dans les tubes de 5ml de milieu d'API 50

CHL, (seconde série). La DO_{600nm} sera entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à 10^6 - 10^8 UFC/ml.

3. Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés. Les étapes sont les suivantes :

- ➔ inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte, (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation) ;
- ➔ répartir environ 10ml d'eau distillée stérile au fond des alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- ➔ sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux, les bandes [0-19] et [20-39] et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation ;
- ➔ compléter la galerie avec la bande [40-49] ;
- ➔ répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :
 - incliner la galerie légèrement vers l'avant ;
 - éviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule ;
 - remplir les cupules avec l'huile de vaseline stérile.
- ➔ Incuber les galeries à 37°C

Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé ou noir). Les résultats sont lus après 24h et vérifiés après 48h d'incubation. L'interprétation des résultats a été faite en utilisant la base de données : <https://lab.upbm.org/identifieur/galerie.php> .

▪ **Résistance au tellurite**

La tolérance au tellurite a été recherchée sur MRS additionnée de 0,4% de tellurite de potassium. Les boîtes de Pétri ont été ensemencées par des stries très serrées d'une culture jeune de souche lactique et incubé à 37°C pendant 24h. Les souches résistantes au tellurite donnent des colonies noires (**Idoui, 2009**).

II.2.2.8 Caractérisation d'intérêt sanitaire

▪ **Test d'hémolyse**

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang. Après incubation à 37°C pendant 24h, le type d'hémolyse a été examiné. Il peut être α -hémolytiques en présentant une couleur verte autour des colonies ; β -hémolytiques quand nous distinguons un éclaircissement autour des colonies ou γ -hémolytiques quand le milieu reste inchangé (**Idoui, 2009**).

▪ **Hydrolyse de la gélatine**

La gélatinase ou collagénase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. Il s'agit d'une Zn-métalloprotéase capable d'hydrolyser la β -insuline, la

gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine et d'autres peptides biologiquement actifs (**Jett et al., 1994 ; Fisher et Phillips, 2009**). L'hydrolyse de la gélatinase se fait dans un milieu à 12% de gélatine. Chaque tube a été ensemencé par piqure centrale avec chaque souche lactique à l'aide d'une pipette pasteur, et incubé à 37°C pendant 24 à 48h. Après la durée d'incubation, les tubes ont été transférés à +4°C durant 2h. L'aspect liquide du milieu reflète un résultat positif, pendant que le maintien du milieu solide démontre l'incapacité des souches lactiques à hydrolyser la gélatine (**Huggins et Sandine, 1984**).

II.2.2.9 Caractérisation technologique et enzymatique

- **Cinétique de croissance**

Le test de la cinétique de croissance consiste à réaliser des séries de cultures pour la même souche lactique et de suivre l'absorbance (DO) de chaque série avec les intervalles de temps suivant : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h et 72h. Pour ce faire, nous avons ensemencé 100ml de milieu MRS bouillon avec 500µl d'une culture jeune ($DO_{\text{initiale à } 620} = 0,5$ Mc Farland) ; puis nous avons réparti les 100ml dans des tubes à raison de 10ml/tube. Chaque tube a été incubé à 37°C. Après chaque durée d'incubation nous avons mesuré la DO à 620nm (**Essid et al., 2009**).

- **Pouvoir acidifiant**

L'étude du pouvoir acidifiant consiste à suivre l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et à doser simultanément, l'acidité totale par la soude 9N (**Larpen, 1997**). Pour ce faire, nous avons ensemencé 100ml de lait écrémé et reconstitué à 10%, avec 500µl d'une culture lactique jeune ($DO_{\text{initiale à } 620} = 0,5$ Mc Farland). Le lait a été, ensuite réparti dans des tubes à essais à raison de 10ml/tube et incubé à 37°C à un intervalle de temps de 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h et 72h. Après chaque durée d'incubation, nous avons mesuré le pH et l'acidité Dornic après avoir titré le lait écrémé par la soude Dornic (N/9) en présence de cinq gouttes de phénolphthaléine jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins pendant 10s. L'acidité est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

- **Activité amylolytique**

L'activité amylolytique a été effectuée en ensemencant un milieu ordinaire à base d'amidon. L'amidon a été stérilisé par filtration sur membrane millipore (0,45µm) et additionné aseptiquement, après refroidissement du milieu de culture à 45°C. Après solidification du milieu, nous avons ensemencé les souches lactiques par touche à la surface du milieu gélosé (**Olympia et al., 1995 ; Naveena et al., 2004 ; Vamanu et al., 2005**). Après une incubation à 30°C pendant quatre jours, nous avons inondé les boîtes de Pétri avec une solution d'iodo-iodurée ou lugol (10g/l d'iode et 20g/l d'iodate de potassium) pendant 15 à 30mn. La présence d'une zone claire autour des colonies traduit une activité amylolytique positive.

- **Pouvoir protéolytique**

Le présent test a été effectué sur deux milieux qui sont MRS agar additionné de 10% de lait écrémé stérile à 0% de MG (**Vuillemand, 1986**) et le milieu Yeast Milk Agar (**Thivierge, 1999**). Ceci afin de mettre en évidence l'hydrolyse de la caséine par le biais des protéases. Sur chacun des milieux, nous avons déposé des disques stériles chargés de 10 μ l d'une culture jeune. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 48 à 72h. L'hydrolyse de la caséine est mise en exergue par l'apparition d'une zone claire autour des disques.

- **Pouvoir lipolytique**

Ce test a été réalisé sur gélose MRS additionné du Tween 80 et du Tween 20 à raison de 1ml/100ml (v/v). Les lipases d'origine microbienne permettent de transformer les triglycérides en glycérides partiels (mono et di- glycérides) et en acides gras (**Choisy et al., 1984**). Pour ce faire, nous avons adopté la même technique utilisée pour l'étude du pouvoir protéolytique (**voir la section ci-dessus**).

- **Pouvoir texturant**

Le pouvoir texturant est mis en évidence sur une gélose hyper-saccharosée. Nous avons ensemencé chaque culture jeune en stries ; les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Le pouvoir texturant se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (**Leveau et al., 1991**).

- **Pouvoir épaississant**

Ce test a été effectué en ensemencant 10ml de lait écrémé (0% MG) reconstitué à 12% et additionné de saccharose à raison de 12%, avec 500 μ l d'une culture jeune (**Bourgeois et Leveau, 1991 ; Bourgeois et Larpent, 1996**). Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 à 48h. Notons que les isolats lactiques possédant un pouvoir épaississant, rendent le gel formé visqueux (rhéologie visqueuse).

- **Pouvoir aromatisant**

La capacité des bactéries lactiques à produire des composés aromatiques synthétisés au cours des processus de fermentation a été mise en évidence sur le lait écrémé reconstitué à 10%. Chaque tube contenant 10ml de lait a été ensemencé avec 500 μ l d'une culture jeune de bactérie lactique et incubé à 37°C. Après 24h et après coagulation du lait, nous avons ajouté à chacun des tubes, cinq gouttes des deux réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII et laissé les tubes se reposer durant 10mn. L'apparition d'une coloration rose persistante ou d'un anneau rouge reflète la formation d'arôme suite à la possession de la souche lactique d'une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses : c'est la voie butylénglycolique (**Zourari et al., 1992**).

- **Pouvoir coagulant**

Nous avonsensemencé des flacons contenant 100ml de lait écrémé stérile reconstitué à 10%, avec 500µl d'une culture jeune de bactérie lactique. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 48h, nous avons mesuré le volume de lactosérum exsudé et avons noté l'aspect du coagulum obtenu (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

- **Pouvoir autolytique**

Nous avons cultivé chaque souche lactique dans le tampon PBS (0,1M et pH 7,2) à 37°C pendant 18h (DO_{620} = entre 0,2 et 0,5 Mc Farland). Après la durée d'incubation, nous avons centrifugé chaque culture à 12000g pendant 2mn, puis lavé en duplicata et ré-suspendues de nouveau dans 1ml de tampon PBS. Les cellules suspendues ont subies une congélation à -20°C pendant 24h. Après décongélation, le milieu a été incubé à 37°C pendant 24h. L'activité autolytique est déterminée par le pourcentage d'abaissement et l'absorbance à 620nm, qui est définit selon la formule suivante (**Piraino et al., 2008**) :

$$AA = (A_i - A_t) / A_i \times 100$$

A_i : Absorbance initiale

A_t : Absorbance après t jours d'incubation

II.2.2.10 Étude de l'activité antifongique des bactéries lactiques

La recherche de l'activité antifongique des isolats lactiques sélectionnés a été réalisée en trois étapes. La première consiste en un test qualitatif et les résultats obtenus ont ensuite été confirmés par le deuxième test qui est quantitatif ; la dernière est l'étude de l'activité antifongique des métabolites extracellulaires des différentes bactéries lactiques. Dans un second temps, nous avons déterminé la nature de ces métabolites par CCM.

- **Test qualitatif (Méthode de deux stries ou double couches)**

Pour la recherche de l'activité antifongique des isolats, la méthode de doubles couches ou de recouvrement décrite par **Magnusson et al. (2003)** a été utilisée. Les bactéries lactiques ont été d'abordensemencées en deux stries de 2cm de longueur, au centre (en laissant 2 à 3cm entre les deux stries) d'une boîte de Pétri contenant 15ml de la gélose MRS, puis incubés en anaérobiose à 30°C pendant 48h. Les colonies obtenues ont été ensuite recouvertes avec 10ml de milieu PDA à 0,8% d'agar contenant 10^6 spores.ml⁻¹ de souche fongique. Après 72h d'incubation à 25°C, les zones d'inhibition ont été évaluées autour de chaque strie de bactéries selon les annotations suivantes :

(-) : Absence de zone d'inhibition autour de chaque strie ;

(+) : Zone d'inhibition par strie comprise entre 0,1 et 3% de la surface des boîtes de Pétri ;

(++) : Zone d'inhibition par strie comprise entre 3 et 8 % de la surface des boîtes de Pétri ;

(+++): Zone d'inhibition par strie supérieur à 8% de la surface des boîtes de Pétri.

- **Test quantitatif (Co-culture sur milieu solide)**

La méthode utilisée est celle décrite par **Florjanowicz (2001)**. 200µl d'une culture jeune ont été prélevés et ensemencés en profondeur dans 15ml du milieu MRS. Après solidification du milieu de culture, un disque stérile de 6mm de diamètre a été déposé à la surface au centre, puis a été saturé avec 10µl de suspension sporale. Les cultures ont été incubées à 25°C et le suivi a été réalisé pendant 12 jours. Un témoin a été jugé nécessaire pour chaque souche fongique, il s'agit, en fait, d'ensemencer la moisissure en l'absence de la bactérie lactique. Pour déterminer l'influence des isolats bactériens, la croissance radiale des souches fongiques a été mesurée tous les deux jours dans deux directions perpendiculaires. L'activité antifongique est exprimée en termes d'inhibition de la croissance de la colonie fongique comme suit :

$$\text{Inhibition (I) ou activité antifongique (A.A.F)} = 100 \times [1 - (\text{DE} / \text{DT})]$$

DE : diamètre de la colonie dans l'échantillon.

DT : diamètre de la colonie dans le témoin.

- **Mesure de l'activité antifongique des métabolites extracellulaires**

La méthode utilisée est celle décrite par **Cabo et al.** en **2002** et modifiée par **Dalié en 2010**. 100ml du milieu MRS bouillon contenu dans des flacons de 250ml ont été inoculés avec une culture jeune de la souche lactique à 1% (v/v). La culture a été incubée à 30°C pendant 72 à 120h. Après la durée d'incubation, 20ml du milieu de culture ont été prélevés et centrifugés à 5000g pendant 20mn à 4°C puis, stérilisés par filtration (millipore 0,22µm). 2ml du surnageant ont été prélevés et mélangés avec 15ml de milieu PDA. Le milieu obtenu a été homogénéisé puis coulé dans une boîte de Pétri. Après solidification, 3µl de la suspension sporale ont été déposés à la surface puis l'ensemble a été incubé à 25°C pendant 5 jours.

Le diamètre de la colonie de la souche fongique a été comparé à celui du témoin dans lequel le surnageant a été remplacé par de l'eau distillée stérile. La détermination de l'effet antifongique des bactéries lactiques a été réalisée par la mesure de la croissance radiale des souches fongiques tous les deux jours dans deux directions perpendiculaires. L'activité antifongique est exprimée en termes d'inhibition de la croissance de colonie comme suit :

$$\text{Inhibition (I) ou activité antifongique (A.A.F)} = 100 \times [1 - (\text{DE} / \text{DT})]$$

DE : diamètre de la colonie fongique en présence du métabolite extracellulaire.

DT : diamètre de la colonie fongique témoin.

- **Détermination de la nature des métabolites extracellulaires des LAB**

L'extraction et la concentration des métabolites extracellulaires des bactéries lactiques ont été faites selon le protocole de **Chen et al. (2010)**. Une pré-culture a été réalisée en inoculant 10ml de bouillon MRS avec une culture bactérienne pendant 24h à 30°C. Ensuite, ce volume a été transféré dans 100ml de bouillon MRS et incubé à 30°C pendant 72 à 120h. Le moût de culture a été centrifugé à 10000g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant récupéré a

été mélangé avec du chloroforme, éthanol et/ou méthanol à une ration de 1/1 (v/v). Après une décantation, la solution organique a été séparée et évaporée à sec à 45°C. L'extrait sec a été ensuite repris dans 3ml du chloroforme/éthanol/méthanol.

50µl de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une micropipette sous forme de spot à 1cm du bord inférieur de la plaque de CCM. Cette plaque a été, ensuite maintenue verticalement dans une cuve de CCM contenant 100 ml de solvant. Le système de solvants utilisé étant : Chloroforme–méthanol–ammoniaque [8 : 1 : 1, v / v] (**Badji et al., 2005**). L'atmosphère de la cuve a été saturée pendant deux heures, avant d'y introduire la plaque. La chromatographie a été arrêtée lorsque le front de migration du solvant arrive à 1cm du bord supérieur de la plaque. La révélation s'est faite à l'œil nu, après chauffage de la plaque CCM à 110°C pendant 20mn en utilisant les révélateurs chimiques suivants :

- ➔ la ninhydrine : révélateur de la fonction amines.
- ➔ le réactif de Molish : révélateur des sucres.
- ➔ le chlorure de fer (FeCl) : révélateur des fonctions phénols.
- ➔ le dichromate de potassium : révélateur des lipides.

Notons que le rapport frontal (Rf) de chaque tâche a été calculé par la formule suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance de migration entre le dépôt et la tache}}{\text{Distance de migration entre le dépôt et le front du solvant}}$$

▪ Analyses statistiques

L'analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification a été réalisée pour comparer le niveau de signification entre les valeurs à $p < 0,05$ qui sont considérées comme significatives. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel MINITAB 18.

II.2.2.11 Activité anti-DON

Cette méthode (**Kaktchman et al., 2018**) a été utilisée vis-à-vis de *F. graminearum* Chemotype DON. La technique consiste à mettre pour chaque LAB, 20ml du milieu gMRS (10ml du milieu GYEP +10ml du milieu MRS) dans trois tubes de la manière suivante :

- ➔ **Tube 1** : Témoin 1, ajouter 500µl de 10^4 spore pour chaque souche fongique (incubation en aérobiose).
- ➔ **Tube2** : Témoin 2, ajouter 500µl de 10^8 de LAB pour chaque souche lactique (incubation en anaérobiose).
- ➔ **Tube 3** : Test, ajouter 500µl de 10^4 spore et 500µl de 10^8 LAB (incubation en aérobiose).

Après 15 jours d'incubation, la biomasse fongique formée a été éliminée par filtration. Ensuite nous avons pesé le poids de la biomasse fongique avant et après étuvage pendant 24h à 60°C. Le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$I (\%) = (1 - C_n / C_o) \times 100$$

C_n : diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste.

C_o : diamètre moyen des colonies témoins.

Le filtrat, une fois récupéré, est passé par les mêmes étapes que celles effectuées pour l'extraction du DON à partir des souches fusariennes (**voir la section II.1.3.6.1**). Les extraits concentrés par rotavapor ont été élués par CCM. L'éluant étant un mélange de chloroforme/méthanol (70:30 v/v). Par la suite, les plaques ont été révélées par le chlorure d'aluminium (AlCl₃) après un chauffage de 7 à 10mn à 110°C (**Trucksess et al., 1984**). Les plaques une fois chauffées, le DON apparaît sous éclairage ultraviolet à grande longueur d'ondes sous la forme d'une tache de fluorescence bleue.

Chapitre III :

Résultats et interprétations

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III.1 Première partie : Identification et caractérisation des moisissures des blés

III.1.1 Caractérisation chimiques des blés

III.1.1.1 Caractérisation chimiques des blés durs locaux

Les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessous montrent que le pourcentage de la teneur en eau des échantillons de blé dur local des trois provenances (Oum chegag, Taghit et Tabelbala), est largement inférieur à 14%, taux maximal exigé par la réglementation nationale et internationale. Il oscille entre un minimum de $5,94\pm 0,25\%$ et un maximum de $9,14\pm 3,98\%$ pour le BDL₀, entre un minimum de $4,62\pm 0,04\%$ et un maximum de $5,03\pm 0,41\%$ pour le BDL₁ et entre un minimum de $3,09\pm 0,18\%$ et un maximum de $7,05\pm 5,49\%$ pour le blé dur de Tabelbala (BDL₂). Pour ce qui est du pH, les blés durs locaux sont neutres, voire légèrement acides : entre un pH 5,41 et 6,76 pour BDL₀, pH 5,73 et 6,11 pour BDL₁ et pH 5,69 et 6,13 pour BDL₂.

Tableau III.1 : Résultats de la caractérisation chimique des blés durs locaux.

Type de Blé	Code	Echt	Résultats chimiques	
			%HR*	pH
Blé dur local (Oum chegag)	BDL ₀	E1	7,73±0,07	6,61
		E2	6,97±0,80	6,66
		E3	8,14±0,81	6,76
		E4	6,48±0,33	5,54
		E5	9,14±3,98	5,47
		E6	6,29±0,42	5,41
		E7	6,46±0,55	6
		E8	6,10±0,85	6
		E9	5,94±0,25	5,56
		E10	6,29±0,52	5,97
		E11	5,95±0,48	5,88
		E12	6,02±0,42	6
Blé dur local (Taghit)	BDL ₁	E13	5,03±0,41	5,93
		E14	4,80±0,11	6,11
		E15	4,57±0,41	5,87
		E16	4,62±0,04	5,79
		E17	4,65±0,50	5,73
Blé dur local (Tabelbala)	BDL ₂	E18	7,05±5,49	5,9
		E19	3,12±0,14	5,69
		E20	3,10±0,02	6,13
		E21	3,09±0,18	6,05
		E22	3,24±0,07	6,13

* %HR est donnée en la moyenne de trois valeurs ± écart-type

III.1.1.2 Caractérisation chimiques des blés durs importés

Les résultats obtenus révèlent que le taux de l'humidité relative des différents échantillons du blé dur importé de France se situe entre $6.40 \pm 0.33\%$ et 7.97 ± 3.98 Ils sont, entre autre, légèrement acides (**Tableau III.2**).

Tableau III.2 : Résultats de la caractérisation chimique des blés durs importés

Type de Blé	Code	Echt	Résultats chimiques	
			%HR*	pH
Blé dur importé (France)	BDF	E23	6.40 ± 0.33	5.98
		E24	6.75 ± 0.34	5.95
		E25	6.98 ± 0.86	6.05
		E26	7.36 ± 1.00	6.07
		E27	7.97 ± 3.98	6.35
		E28	6.98 ± 1.10	6.05
		E29	7.70 ± 2.71	6.49
		E30	7.36 ± 1.52	6.3
		E31	7.49 ± 0.88	6.06

* %HR est donnée en la moyenne de trois valeurs \pm écart-type

III.1.1.3 Caractérisation chimiques des blés tendres locaux

D'après les résultats résumés dans le **tableau III.3**, nous constatons que les six échantillons du blé tendre de Taghit ont une basse teneur en eau ($4.33 \pm 0.32\%$ à $7.04 \pm 0.25\%$) et un pH plus ou moins acide (5.26 à 5.54).

Tableau III.3 : Résultats de la caractérisation chimique des blés tendres locaux

Type de Blé	Code	Echt	Résultats chimiques	
			%HR*	pH
Blé tendre local (Taghit)	BTL	E32	4.33 ± 0.32	5.53
		E33	4.55 ± 0.80	5.26
		E34	4.44 ± 0.58	5.27
		E35	6.76 ± 0.56	5.54
		E36	7.04 ± 0.25	5.47
		E37	6.93 ± 0.14	5.41

* %HR est donnée en la moyenne de trois valeurs \pm écart-type

III.1.1.4 Caractérisation chimiques des blés tendre importés

Il ressorts des résultats obtenus que les échantillons du blé tendre français sont plus humides par rapport à ceux du blé tendre local. En effet, leur taux d'humidité relative est entre un minimum de $6.14 \pm 0.10\%$ pour l'échantillon E63 et un maximum de $13.21 \pm 1.96\%$ pour l'échantillon E59. Leur pH est d'un minimum de 4.25 (E49) et un maximum de 6.72 (E41). Le tableau ci-après résume les données chimiques des 27 échantillons de BTF.

Tableau III.4 : Résultats de la caractérisation chimique des blés tendres importés

Type de Blé	Code	Echt	Résultats chimiques	
			%HR*	pH
Blé tendre importé (France)	BTF	E38	10.48±1.02	6.63
		E39	8.09±1.62	6.66
		E40	8.47±1.73	6.69
		E41	10.34±0.11	6.72
		E42	10.53±0.10	6.45
		E43	10.46±0.15	6.50
		E44	8.62±0.49	5.2
		E45	7.72±0.05	5.42
		E46	8.51±0.11	4.8
		E47	9.34±0.78	5.35
		E48	8.45±1.29	5.41
		E49	12.29±2.64	4.25
		E50	8.03±1.02	6.20
		E51	8.09±0.98	6.10
		E52	8.06±0.86	6.06
		E53	7.88±0.01	6.09
		E54	8.92±0.12	6.07
		E55	8.10±0.31	6.08
		E56	8.68±0.10	5.80
		E57	8.65±0.14	5.33
E58	8.78±0.19	5.55		
E59	13.21±1.96	5.53		
E60	6.51±0.03	5.68		
E61	6.38±0.11	5.77		
E62	6.33±0.05	6.65		
E63	6.14±0.10	5.60		
E64	6.45±0.07	5.61		

* %HR est donnée en la moyenne de trois valeurs ± écart-type

III.1.2 Caractérisation mycologiques des blés

III.1.2.1 Flore fongique

Les résultats du dénombrement de la flore fongique totale de chaque échantillon des différents blés seront donnés par milieu d'isolement (PDA et DCPA). Les différents résultats sont donnés en la moyenne de deux valeurs ± écart-type.

- **Flore fongique des blés durs**

L'exploitation des résultats mentionnés dans les **tableaux III.5** et **III.6**, montrent que les différents échantillons de blé dur sont contaminés par les espèces qui appartiennent à la flore de stockage et à celle de champ. Nous citons : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Ulocladium*. Le taux de contamination enregistré dans le milieu PDA oscille en moyenne entre 0 UFC/g pour l'échantillon E11 et 72×10^2 UFC/g pour l'échantillon E2 d'Oum Chegag, entre 0.5×10^2 UFC/g pour E13 et 25×10^2 UFC/g pour E14 du blé dur de Taghit et entre 1×10^2 UFC/g pour l'échantillon E19 et 100×10^2 UFC/g pour

l'échantillon E21 de Tabelbala ; pendant que les échantillons du blé dur importé présentent une contamination qui varie entre un minimum de 7×10^2 UFC/g (E30 et E31) et un maximum de 583.5×10^2 UFC/g (E27). Notons que plusieurs boîtes du présent milieu ont été contaminées par *Rhizopus* à raison d'un pourcentage qui varie entre 50% et 100%.

Pour ce qui est du milieu sélectif DCPA, les résultats obtenus révèlent une contamination moyenne variant entre 10×10^2 UFC/g pour l'échantillon E11 et 12 du blé dur d'Oum Chegag et 123.5×10^2 UFC/g pour l'échantillon E1 du même blé ; alors qu'elle est plus importante pour les échantillons du blé dur de Taghit (68×10^2 UFC/g pour E17 et 115×10^2 UFC/g pour E15). Le blé dur de Tabelbala, quant à lui, montre un nombre de flore fongique minimal nul pour E19 et un nombre d'unité fongique maximal de 135×10^2 UFC/g pour E18. Les échantillons du blé dur importé abritent une flore fongique moyenne entre 0 UFC/g (E26 et E28) et 89.5×10^2 UFC/g (E29).

Nous enregistrons la dominance des genres *Penicillium* et *Aspergillus* en nombre et en fréquence de contamination dans les blés durs locaux suivis de *Cladosporium* et d'*Alternaria*. Notons que les *Fusarium* sont représentés exclusivement par l'espèce *F. oxysporum*. Les échantillons du blé dur français, par contre, sont dominés par les *Fusarium* suivis des espèces penicilliennes.

▪ Flore fongique des blés tendres

Les résultats obtenus, révèlent que les différents échantillons de blé tendre local et importé sont contaminés par les espèces des genres suivants : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Penicillium*. Le taux de contamination enregistré diffère d'un échantillon à un autre et d'un blé à un autre. En effet, dans le milieu PDA, la contamination oscille en moyenne entre 69.5×10^2 UFC/g pour l'échantillon E32 et 315×10^2 UFC/g pour l'échantillon E37 du blé tendre local de Taghit ; pendant que les 27 échantillons du blé tendre importé de France, exposent une contamination fongique qui varie entre un minimum de 1×10^2 UFC/g pour E62 et un maximum de 1199.5×10^2 UFC/g pour E44. De même, plusieurs boîtes du présent milieu ont été contaminées par *Rhizopus* (**Tableaux III.7**). Le blé tendre local est dominé par les genres *Aspergillus* avec un total de 523.5×10^2 UFC/g et *Penicillium* avec un total de 497.5×10^2 UFC/g, suivi de *Cladosporium* avec un total de 45.5×10^2 UFC/g. Alors que le blé tendre importé est dominé par *Fusarium* (1452.5×10^2 UFC/g), *Cladosporium* (1083×10^2 UFC/g) et *Penicillium* (1026×10^2 UFC/g), suivis d'*Aspergillus* (709×10^2 UFC/g).

Pour ce qui le concerne, le milieu DCPA nous a permis l'isolement d'une flore fongique totale moyenne à partir du blé tendre local, qui varie d'un minimum de 0 UFC/g (E33) à un maximum de 235×10^2 UFC/g (E32) ; pendant que le blé tendre importé est contaminé en moyenne entre un minimum de 0 UFC/g (E41, E53 et E54) et un maximum de 825×10^2 UFC/g (E44) (**Tableaux III.8**). Les échantillons de blé tendre local sont dominés par *Aspergillus* (425.5×10^2 UFC/g) et *Penicillium* (157.5×10^2 UFC/g), alors que ceux du blé tendre importé sont dominés par *Fusarium* (2184.5×10^2 UFC/g), *Penicillium* (658.5×10^2 UFC/g), *Cladosporium* (570×10^2 UFC/g) et *Aspergillus* (400.5×10^2 UFC/g).

Tableau III.5 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé dur local et importé sur milieu PDA

Type de Blé	Code	Echt	Résultats mycologiques (UFC/g)*						
			Flore totale	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Ulocladium</i>
Blé dur local (Oum chegag)	BDL ₀	E1	57.3×10 ² ±34.65	5×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	36.5×10 ² ±6.36	/	11×10 ² ±14.14	/
		E2	72×10 ² ±15.56	10×10 ² ±0	10×10 ² ±0	25×10 ² ±7.07	5.5×10 ² ±7.78	21.5×10 ² ±0.71	/
		E3	62.5×10 ² ±44.55	/	11×10 ² ±0	35.5×10 ² ±36.06	/	16×10 ² ±8.49	/
		E4	26×10 ² ±7.07	1×10 ² ±0	15×10 ² ±7.07	/	/	10×10 ² ±14.14	/
		E5	40×10 ² ±14.14	5×10 ² ±7.07	/	/	/	25×10 ² ±7.07	/
		E6	42×10 ² ±57.98	0.5×10 ² ±0.07	16×10 ² ±23.34	/	/	25×10 ² ±35.36	/
		E7	5×10 ² ±7.07	/	5×10 ² ±7.07	/	/	/	/
		E8	25×10 ² ±21.21	/	25×10 ² ±21.21	/	/	/	/
		E9	25×10 ² ±21.21	/	/	/	/	25×10 ² ±21.21	/
		E10	5×10 ² ±7.07	/	/	/	/	5×10 ² ±7.07	/
		E11	/	/	/	/	/	/	/
		E12	10×10 ² ±14.14	/	/	/	/	10×10 ² ±14.14	/
Blé dur local (Taghit)	BDL ₁	E13	0.5×10 ² ±0.71	/	/	/	/	0.5×10 ² ±0.71	/
		E14	25×10 ² ±35.36	/	15×10 ² ±21.21	/	/	10×10 ² ±14.14	/
		E15	2.5×10 ² ±2.12	/	1.5×10 ² ±2.12	0.5×10 ² ±0.71	/	0.5×10 ² ±0.71	0.5×10 ² ±0.71
		E16	2×10 ² ±1.41	/	1.5×10 ² ±0.71	/	/	0.5×10 ² ±0.71	/
		E17	2×10 ² ±2.83	/	/	/	/	2×10 ² ±2.83	/
Blé dur local (Tabelbala)	BDL ₂	E18	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/	/
		E19	1×10 ² ±1.41	1×10 ² ±1.41	/	/	/	/	/
		E20	95×10 ² ±134.35	50×10 ² ±70.71	25×10 ² ±35.36	20×10 ² ±28.28	/	/	/
		E21	100×10 ² ±14.14	20×10 ² ±28.28	25×10 ² ±35.36	25×10 ² ±35.36	/	30×10 ² ±42.43	/
		E22	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/	/
Blé dur importé (France)	BDF	E23	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/	/
		E24	8.5×10 ² ±7.78	/	2.5×10 ² ±0.71	/	/	6×10 ² ±7.07	/
		E25	11.5×10 ² ±3.54	/	/	/	0.5×10 ² ±0.71	11×10 ² ±4.24	/
		E26	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/	/
		E27	583.5×10 ² ±805.39	/	/	/	583.5×10 ² ±805.39	/	/
		E28	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/	/
		E29	55×10 ² ±21.21	/	/	/	5×10 ² ±7.07	50×10 ² ±28.28	/
		E30	7×10 ² ±1.41	/	0.5×10 ² ±0.71	/	6.5×10 ² ±2.12	/	/
		E31	7×10 ² ±7.07	/	/	/	/	7×10 ² ±1.41	/

*Le résultat est donné en la moyenne de deux valeurs ± écart-type

Tableau III.6 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé dur local et importé sur milieu DCPA

Type de Blé	Code	Echt	Résultats mycologiques (UFC/g)*						
			Flore totale	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Ulocladium</i>
Blé dur local (Oum chegag)	BDL₀	E1	123.5×10 ² ±44.55	42×10 ² ±12.73	/	55×10 ² ±35.36	1×10 ² ±1.41	25.5×10 ² ±20.50	/
		E2	67×10 ² ±5.66	15.5×10 ² ±20.50	0.5×10 ² ±0.71	15×10 ² ±7.07	/	36×10 ² ±19.80	/
		E3	111.5×10 ² ±54.45	60×10 ² ±42.43	5.5×10 ² ±7.78	10×10 ² ±14.14	5×10 ² ±7.07	31×10 ² ±1.41	/
		E4	67.5×10 ² ±23.34	/	41.5×10 ² ±16.26	15×10 ² ±21.21	/	1×10 ² ±0	10×10 ² ±14.14
		E5	60.5×10 ² ±0.70	/	15×10 ² ±21.21	15×10 ² ±21.21	/	30.5×10 ² ±0.71	/
		E6	40×10 ² ±0	/	35×10 ² ±7.07	/	/	5×10 ² ±7.07	/
		E7	40×10 ² ±14.14	/	5×10 ² ±7.07	/	/	35×10 ² ±21.21	/
		E8	25×10 ² ±21.21	/	/	/	/	/	/
		E9	35×10 ² ±7.07	/	/	10×10 ² ±14.14	/	25×10 ² ±7.07	/
		E10	20×10 ² ±14.14	/	/	/	/	20×10 ² ±14.14	/
		E11	10×10 ² ±14.14	/	/	/	/	10×10 ² ±14.14	/
		E12	10×10 ² ±0	5×10 ² ±7.07	/	5×10 ² ±7.07	/	/	/
Blé dur local (Taghit)	BDL₁	E13	103.5×10 ² ±12.02	/	32×10 ² ±39.60	15.5×10 ² ±6.36	/	56×10 ² ±33.94	/
		E14	112×10 ² ±14.14	20.5×10 ² ±0.71	70×10 ² ±14.14	5×10 ² ±7.07	/	16.5×10 ² ±7.78	/
		E15	115×10 ² ±43.84	35×10 ² ±49.50	25.5×10 ² ±20.51	20×10 ² ±0	/	34×10 ² ±25.46	0.5×10 ² ±0.71
		E16	90×10 ² ±42.43	10×10 ² ±0	25×10 ² ±35.36	/	/	55×10 ² ±7.07	/
		E17	68×10 ² ±96.17	/	26×10 ² ±36.77	/	/	42×10 ² ±59.40	/
Blé dur local (Tabelbala)	BDL₂	E18	135×10 ² ±91.92	30×10 ² ±28.28	25×10 ² ±7.07	55×10 ² ±77.78	/	25×10 ² ±35.36	/
		E19	/	/	/	/	/	/	/
		E20	9.5×10 ² ±9.19	6×10 ² ±4.24	3.5×10 ² ±4.95	/	/	/	/
		E21	40×10 ² ±56.57	/	/	40×10 ² ±56.57	/	/	/
		E22	112.5×10 ² ±57.28	50×10 ² ±14.14	6×10 ² ±5.66	31.5×10 ² ±30.41	/	25×10 ² ±35.36	/
Blé dur importé (France)	BDF	E23	4.5×10 ² ±34.65	/	2×10 ² ±2	/	/	2.5×10 ² ±3.54	/
		E24	83.5×10 ² ±94.05	/	/	/	75×10 ² ±106.07	8.5×10 ² ±12.02	/
		E25	15×10 ² ±0	/	/	/	15×10 ² ±0	/	/
		E26	/	/	/	/	/	/	/
		E27	56×10 ² ±19.80	/	11×10 ² ±15.57	/	40×10 ² ±0	5×10 ² ±4.24	/
		E28	/	/	/	/	/	/	/
		E29	89.5×10 ² ±21.92	/	/	/	40.5×10 ² ±9.19	49×10 ² ±12.73	/
		E30	3.5×10 ² ±3.54	/	/	/	/	3.5×10 ² ±3.54	/
		E31	8×10 ² ±8.49	/	/	/	7×10 ² ±9.90	1×10 ² ±1.41	/

*Le résultat est donné en la moyenne de deux valeurs ± écart-type

Tableau III.7 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé tendre local et importé sur milieu PDA

Type de Blé	Code	Echt	Résultats mycologiques (UFC/g)					
			Flore totale	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Blé tendre local (Taghit)	BTL	E32	69.5×10 ² ±95.46	/	33.5×10 ² ±44.55	5.5×10 ² ±7.78	/	30.5×10 ² ±43.13
		E33	106×10 ² ±149.91	/	51×10 ² ±72.12	/	/	55×10 ² ±77.78
		E34	238×10 ² ±159.81	/	217.5×10 ² ±159.1	5×10 ² ±7.07	/	15.5×10 ² ±7.78
		E35	162×10 ² ±214.96	/	36×10 ² ±49.50	15×10 ² ±21.21	/	111×10 ² ±144.25
		E36	176×10 ² ±248.90	/	45.5×10 ² ±64.35	20×10 ² ±28.28	/	110.5×10 ² ±156.27
		E37	315×10 ² ±190.92	/	140×10 ² ±56.57	/	/	175×10 ² ±134.35
Blé tendre importé (France)	BTF	E38	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/
		E39	122.5×10 ² ±43.13	/	56.5×10 ² ±6.36	15×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	46×10 ² ±35.36
		E40	121×10 ² ±83.44	/	70×10 ² ±42.43	/	/	51×10 ² ±41.01
		E41	250×10 ² ±226.27	/	70×10 ² ±84.85	10×10 ² ±0.	70×10 ² ±56.57	100×10 ² ±84.85
		E42	171.5×10 ² ±19.09	/	18.5×10 ² ±3.54	55×10 ² ±7.07	88×10 ² ±36.77	10×10 ² ±14.14
		E43	36×10 ² ±9.90	/	22.5×10 ² ±27.58	11×10 ² ±15.56	/	2.5×10 ² ±2.12
		E44	1199.5×10 ² ±89.80	/	50×10 ² ±14.14	345×10 ² ±63.64	624.5×10 ² ±181.72	180×10 ² ±42.43
		E45	890×10 ² ±134.35	/	180×10 ² ±98.99	105×10 ² ±28.28	280×10 ² ±169.71	325×10 ² ±106.06
		E46	715×10 ² ±7.07	/	160×10 ² ±8.48	/	305×10 ² ±8.48	250×10 ² ±7.07
		E47	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/
		E48	100 % Rhizopus	/	/	/	/	/
		E49	3×10 ² ±4.24	/	2.5×10 ² ±3.54	/	/	0.5×10 ² ±0.71
		E50	221.5×10 ² ±16.26	1.5×10 ² ±2.12	/	220×10 ² ±14.14	/	/
		E51	108.5×10 ² ±21.92	30×10 ² ±14.14	/	25×10 ² ±7.07	53.5×10 ² ±0.71	/
		E52	44.5×10 ² ±7.78	20.5×10 ² ±3.54	23.5×10 ² ±3.54	0.5×10 ² ±0.71	/	/
		E53	64×10 ² ±33.94	/	5×10 ² ±7.07	43.5×10 ² ±19.09	5×10 ² ±7.07	10.5×10 ² ±14.85
		E54	229.5×10 ² ±19.09	/	/	218×10 ² ±33.94	10×10 ² ±14.14	1.5×10 ² ±0.71
		E55	37.5×10 ² ±45.96	5×10 ² ±7.07	2.5×10 ² ±3.54	25×10 ² ±35.36	/	5×10 ² ±7.07
		E56	10×10 ² ±14.14	/	5×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	/	/
		E57	13.5×10 ² ±19.09	0.5×10 ² ±0.71	/	/	/	13×10 ² ±18.38
E58	27.5×10 ² ±34.65	1.5×10 ² ±2.12	26×10 ² ±36.77	/	/	/		
E59	5.5×10 ² ±7.78	/	5.5×10 ² ±7.78	/	/	/		
E60	2×10 ² ±1.41	1×10 ² ±1.41	/	/	/	1×10 ² ±0		
E61	11.5×10 ² ±16.26	0.5×10 ² ±0.71	/	/	1×10 ² ±1.41	10×10 ² ±14.14		
E62	1×10 ² ±1.41	1×10 ² ±1.41	/	/	/	/		
E63	35×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	/	20×10 ² ±0		
E64	22×10 ² ±1.41	5×10 ² ±7.07	6.5×10 ² ±4.95	/	10.5×10 ² ±13.43	/		

Tableau III.8 : Flore fongique totale (en moyenne) des échantillons de blé tendre local et importé sur milieu DCPA

Type de Blé	Code	Echt	Résultats mycologiques (UFC /g)					
			Flore totale	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Blé tendre local (Taghit)	BTL	E32	235×10 ² ±49.50	5×10 ² ±7.07	25×10 ² ±21.21	/	/	205×10 ² ±77.78
		E33	/	/	/	/	/	/
		E34	63×10 ² ±83.44	10.5×10 ² ±13.44	6×10 ² ±5.66	0.5×10 ² ±0.70	/	46×10 ² ±63.64
		E35	80.5×10 ² ±109.60	/	21×10 ² ±29.70	6×10 ² ±5.66	0.5×10 ² ±0.71	53×10 ² ±73.51
		E36	98.5×10 ² ±135.06	6×10 ² ±5.66	10.5×10 ² ±14.85	1×10 ² ±0	/	81×10 ² ±114.55
		E37	157×10 ² ±91.92	20.5×10 ² ±28.99	95×10 ² ±63.64	/	1×10 ² ±1.41	40.5×10 ² ±0.71
Blé tendre importé (France)	BTF	E38	121.5×10 ² ±13.44	5×10 ² ±7.07	101.5×10 ² ±0.71	/	5×10 ² ±7.07	10×10 ² ±14.14
		E39	48×10 ² ±63.64	/	/	/	36×10 ² ±49.50	12×10 ² ±14.14
		E40	103.5×10 ² ±27.58	/	50.5×10 ² ±28.99	0.5×10 ² ±0.71	15.5×10 ² ±20.51	37×10 ² ±19.80
		E41	/	/	/	/	/	/
		E42	62.5×10 ² ±13.43	/	5×10 ² ±7.07	/	56.5×10 ² ±20.51	/
		E43	13×10 ² ±11.31	/	1×10 ² ±1.41	2×10 ² ±1.41	10×10 ² ±14.14	/
		E44	825×10 ² ±685.89	/	50×10 ² ±21.21	45×10 ² ±7.07	625×10 ² ±756.60	105×10 ² ±84.85
		E45	495×10 ² ±42.43	/	10×10 ² ±0	/	325×10 ² ±7.07	160×10 ² ±49.50
		E46	675×10 ² ±134.35	/	/	300×10 ² ±113.14	275×10 ² ±247.49	100×10 ² ±0
		E47	368×10 ² ±25.46	/	50.5×10 ² ±28.99	/	317×10 ² ±3.54	/
		E48	322.5×10 ² ±4.95	/	10×10 ² ±0	/	312×10 ² ±4.24	0.5×10 ² ±0.71
		E49	180.5×10 ² ±21.92	/	40×10 ² ±7.07	/	140.5×10 ² ±14.85	/
		E50	196.5×10 ² ±64.35	/	5×10 ² ±7.07	191.5×10 ² ±57.28	/	/
		E51	13.5×10 ² ±2.12	0.5×10 ² ±0.71	/	0.5×10 ² ±0.71	12.5×10 ² ±2.12	/
		E52	81×10 ² ±36.77	33.5×10 ² ±45.96	9.5×10 ² ±2.12	5×10 ² ±7.07	28×10 ² ±2.83	5×10 ² ±7.07
		E53	/	/	/	/	/	/
		E54	/	/	/	/	/	/
		E55	10.5×10 ² ±0.71	/	/	/	5.5×10 ² ±6.36	5×10 ² ±7.07
		E56	16×10 ² ±7.07	/	0.5×10 ² ±0.71	/	5×10 ² ±7.07	10.5×10 ² ±14.85
		E57	33×10 ² ±1.41	/	/	/	/	33×10 ² ±1.41
E58	56×10 ² ±7.07	/	/	/	/	56×10 ² ±7.07		
E59	61.5×10 ² ±27.58	10.5×10 ² ±0.71	5×10 ² ±7.07	15×10 ² ±21.21	/	31×10 ² ±1.41		
E60	41.5×10 ² ±30.41	/	0.5×10 ² ±0.71	5×10 ² ±7.07	5×10 ² ±7.07	31×10 ² ±29.70		
E61	27.5×10 ² ±20.51	/	10×10 ² ±14.14	0.5×10 ² ±0.71	5.5×10 ² ±6.36	11.5×10 ² ±12.02		
E62	46×10 ² ±48.08	/	15×10 ² ±21.21	/	0.5×10 ² ±0.71	30.5×10 ² ±27.58		
E63	17×10 ² ±7.07	/	6.5×10 ² ±7.78	/	5×10 ² ±7.07	5.5×10 ² ±7.78		
E64	55×10 ² ±35.36	5×10 ² ±7.07	30×10 ² ±42.43	5×10 ² ±7.07	/	15×10 ² ±7.07		

III.1.2.2 Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique des différentes espèces isolées est présentée sous forme d'une fiche d'identification. Il est toutefois, judicieux de noter que certaines espèces pénicilliennes demandent d'être confirmée, et de ce fait, elles n'ont pas été représentées en fiches

Fiche 1 : *Alternaria alternata*

▪ Description microscopique

Les conidies sont de couleur marron foncé, en forme de massue cloisonnée longitudinalement et transversalement. Elles se présentent en chaînes.

▪ Description macroscopique

Les colonies de couleur marron grisâtre et un revers marron à noir, atteignent sur MEA 40 à 43mm de diamètre. Elles sont planes et floconneuses.

Sur CYA, elles couvrent toute la boîte de Pétri en présentant le même aspect et la même couleur que les colonies sur milieu MEA. A 5°C, cette espèce croit tardivement pour atteindre 16mm de diamètre après 15 jours d'incubation. A 37°C, elle couvre toute la boîte de Pétri, son mycélium est de couleur blanche devenant gris foncé.

Sur DCMA, *A. alternata* présente des colonies noires et planes avec un revers noir. Elles atteignent moyennement, 27mm de diamètre après 7 jours d'incubation.

Sur milieu G25N, le mycélium des colonies est dense, de couleur marron clair et d'un revers beige. Elles ont un diamètre moyen de 25mm.

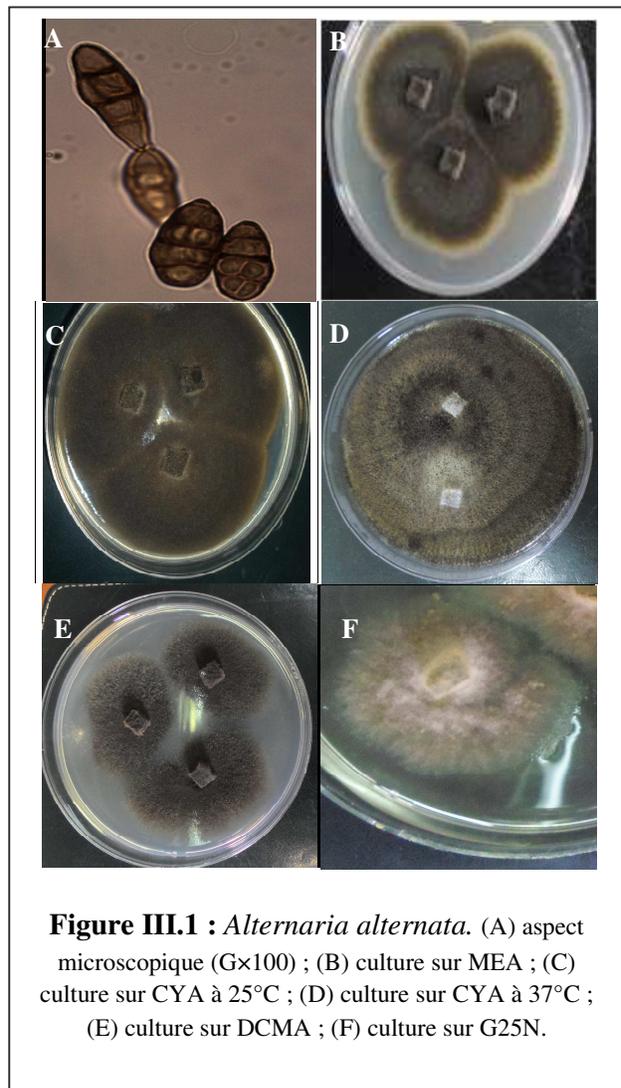


Figure III.1 : *Alternaria alternata*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur CYA à 37°C ; (E) culture sur DCMA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 2 : *Alternaria infectoria*

▪ Description microscopique

Le critère spécifique caractérisant les *Alternaria* est la forme de leurs grandes conidies cloisonnées longitudinalement (1 septum) et transversalement (5 à 7 septa). Les conidies bourgeonnent à travers un ou plusieurs pores de la paroi du conidiophore en chaînes simples ou ramifiées ; ces conidies pluricellulaires sont brunes, en forme de massue avec un rostre (prolongement) apical.

▪ Description macroscopique

Sur milieu MEA, les colonies ont une croissance relativement rapide ; elles sont veloutées et rases avec une périphérie vert foncé, brun-gris à noires. Le revers est marron foncé à noir. Ces colonies ont un diamètre de 43,5 à 53mm.

Sur milieu CYA, elles atteignent un diamètre de 27,5 à 34mm ; elles sont veloutées et présentent un mycélium dense de couleur brun-gris. Le revers est brun-noir. A 5°C et après 7jrs d'incubation, cette espèce germe uniquement. A 37°C nous enregistrons des colonies de 5 à 20mm de diamètre.

Les colonies sur G25N ont un diamètre de 9,5 à 10,5mm, de couleur marron foncé et produisent un pigment marron qui diffuse la gélose.

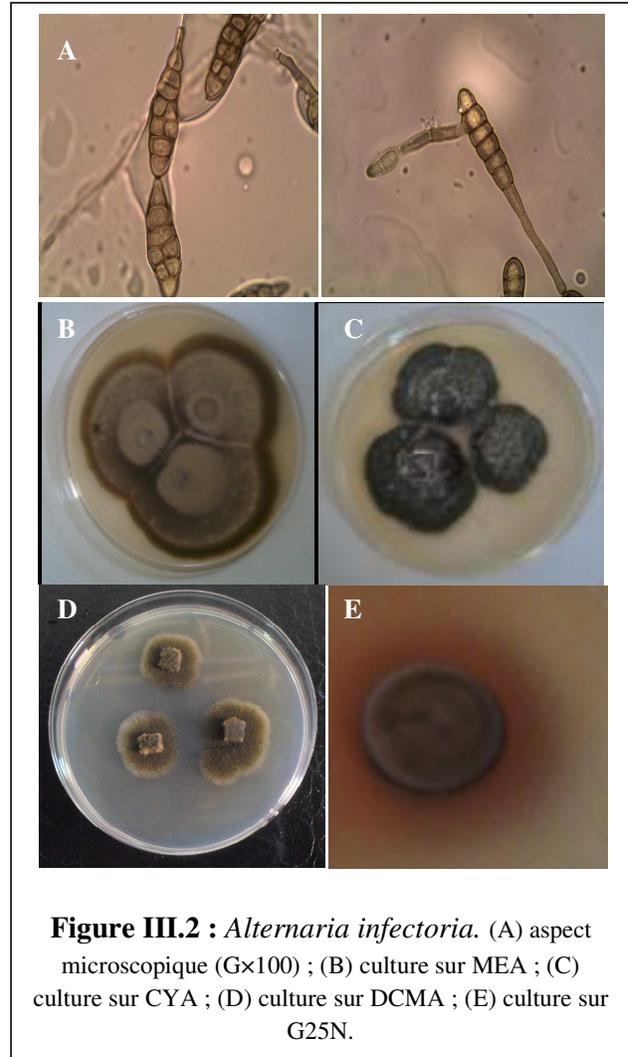


Figure III.2 : *Alternaria infectoria*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur DCMA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 3 : *Aspergillus clavatus*.

▪ **Description microscopique**

Les conidiophores se renflent à leur extrémité terminale formant une vésicule aspergillaire ellipsoïdale étroite qui porte des phialides très serrées.

▪ **Description macroscopique**

Les colonies ont sur CYA et MEA, un diamètre de 40 à 45mm avec un mycélium blanc qui devient turquoise grisâtre sur MEA et beige à marron clair sur CYA. Le revers des colonies est pâle sur les deux milieux. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, les colonies atteignent 50mm de diamètre ; le mycélium est blanc avec des spores bleu gris. Le revers est vert jaune.

Les colonies sur G25N sont de 24,5 à 30,5mm de diamètre, floconneuses et blanches avec un revers de couleur pâle.

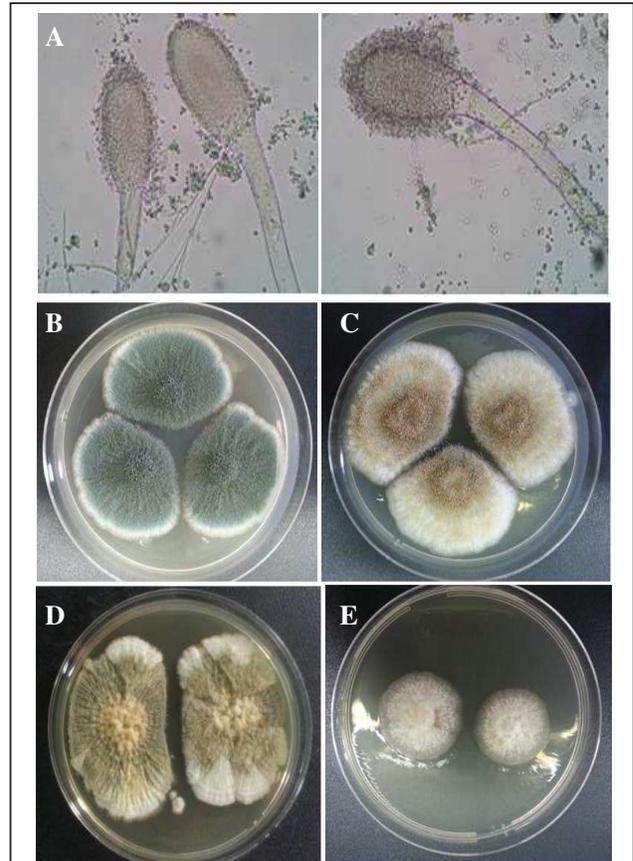


Figure III.3 : *Aspergillus clavatus*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur CYA à 37°C ; (E) culture sur G25N.

Fiche 4: *Aspergillus fischerianus*
(téléomorphe: *Neosartorya fischeri*.)

▪ **Description microscopique**

Les conidiophores incolores se terminent par une tête aspergillière unisériée pyriforme. Les phialides sont portées sur la moitié supérieure de la vésicule aspergillière. Les conidies ont une forme sub-sphéroïdale à ellipsoïdale.

▪ **Description macroscopique**

Les colonies sur MEA de 38 à 44mm de diamètre, sont basses et clairsemées. Le mycélium blanc devient jaune pâle puis brun cannelle ; le revers est jaune brun pâle.

Les colonies sur CYA atteignent 51 à 54mm de diamètre. Elles sont planes, clairsemées, de couleur blanche à jaune pâle avec un revers pâle à brun rosé au centre. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, les colonies couvrent l'ensemble de la boîte de Pétri, elles sont planes présentant des lignes concentriques. Leur mycélium est blanc grisâtre avec un revers pâle.

Les colonies sur G25N sont de 20,5 à 24mm de diamètre ; le mycélium est de couleur beige saumon avec un revers jaune pâle.

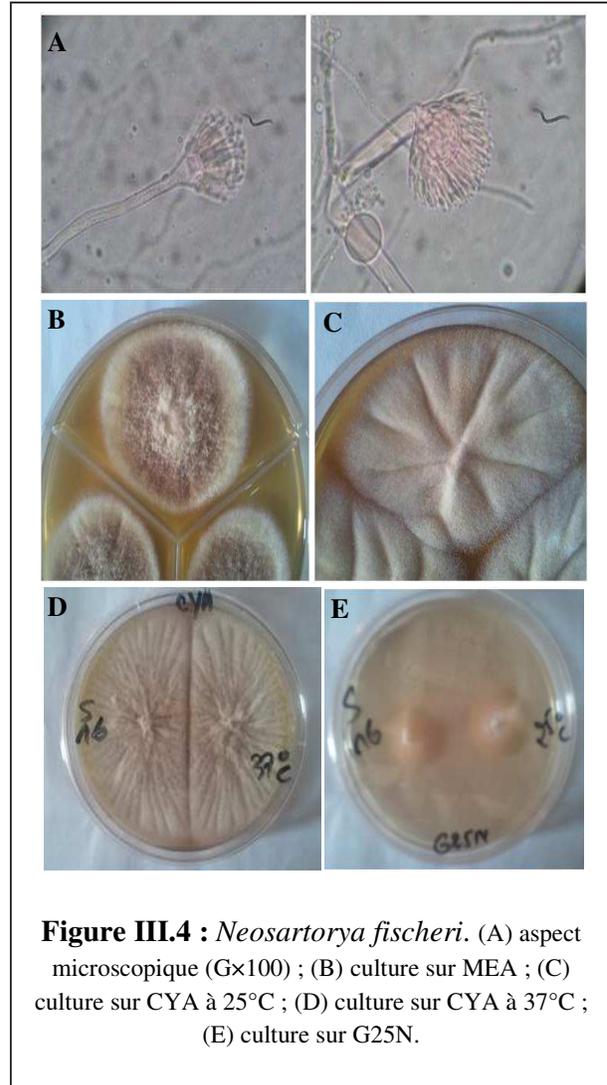


Figure III.4 : *Neosartorya fischeri*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur CYA à 37°C ; (E) culture sur G25N.

Fiche 5 : *Aspergillus flavus*

▪ Description microscopique

Les Conidiophores portent à la fois les métules et les phialides, mais chez certains isolats les têtes portent seulement des phialides. Leurs conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, lisses voire légèrement rugueuses, de couleur vert olive.

▪ Description macroscopique

Cette espèce se caractérise par la couleur jaune vert ou jaune olive, mais parfois jaune pur, puis devient verdâtre avec l'âge. Les sclérotés sont produites par plusieurs isolats d'*A. flavus*. D'abord, elles sont blanches puis deviennent brunes foncé voire rougeâtre ou noires.

Les colonies sur MEA atteignent 41 à 51mm de diamètre, de couleur jaune verdâtre ou vert pistache.

Sur CYA à 25°C, elles atteignent 33 à 60mm de diamètre et parfois plus, elles présentent des couleurs similaires aux colonies sur MEA ou PDA. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, elles sont semblables à celles sur CYA à 25°C, mais plus veloutée avec des conidies vertes olive et d'abondants sclérotés observés chez certaines souches.

Les colonies de couleur jaune poussin et de revers transparent, atteignent, sur G25N, un diamètre de 25 à 40mm.

Sur milieu *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar (APFA)*, le revers de la colonie est de couleur orange caractéristique de cette espèce.

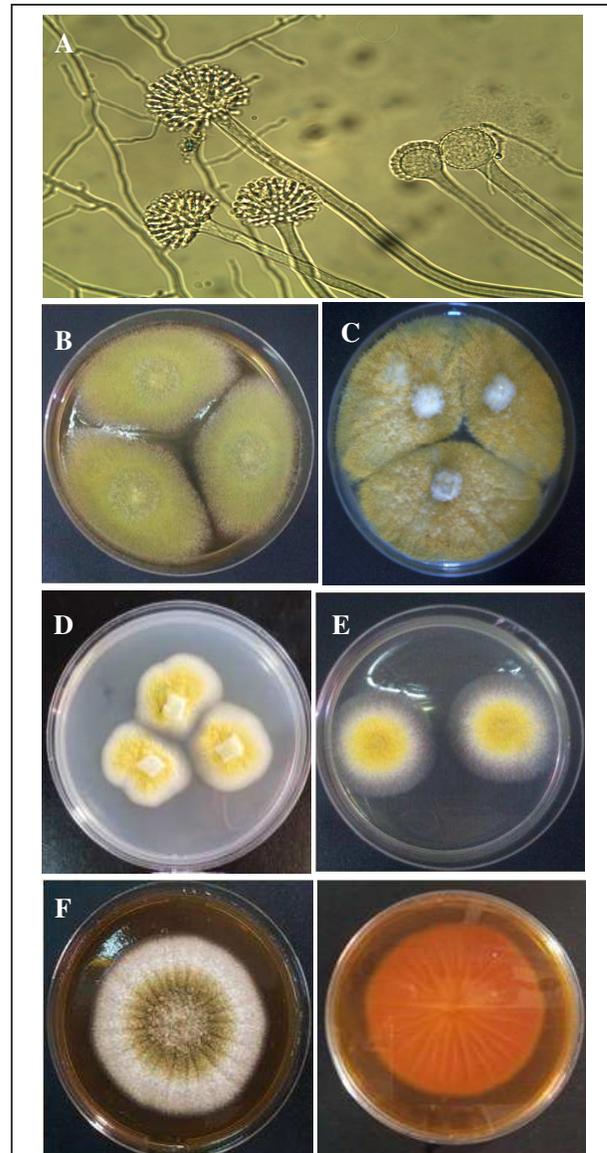


Figure III.5 : *Aspergillus flavus*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur PDA ; (E) culture sur G25N ; (F) culture sur APFA.

Fiche 6 : *Aspergillus fumigatus*

▪ Description microscopique

Les conidiophores s'élargissent pour donner des vésicules piriformes unisériées portant des conidies sphériques.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur MEA atteignent 46 à 50,5mm de diamètre, elles sont planes, denses et veloutées présentant des conidies bleu-vert ou bleu-turquoise foncé avec un revers pâle ou incolore.

Les colonies sur CYA présentent un diamètre moyen de 42,5mm. Elles sont planes, denses et veloutées présentant des rides. Le mycélium est de couleur bronzée à saumon avec des conidies bleu-vert et un revers pâle. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, les colonies couvrent l'ensemble de la surface de la boîte de Pétri et apparaissent identiques aux colonies à 25°C, mais avec des conidies plus sombre, d'un gris verdâtre voire d'un gris souris.

Les colonies sur G25N ont un diamètre allant de 4 à 5mm et chez certaines souches, nous n'enregistrons que la germination des spores.

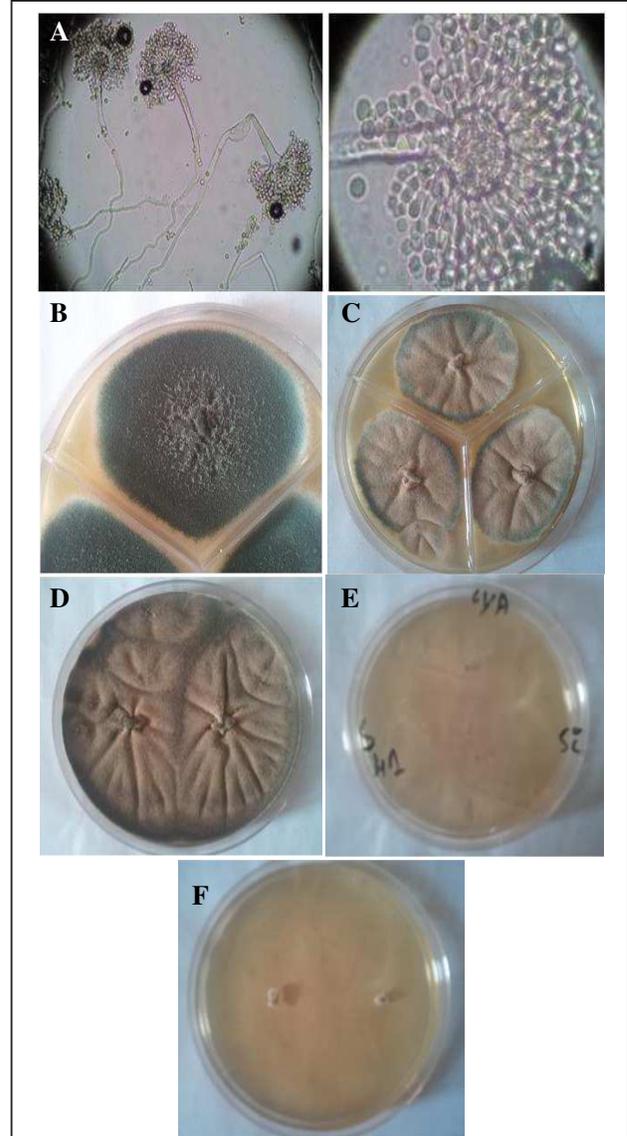


Figure III.6 : *Aspergillus fumigatus*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 7 : *Aspergillus japonicus*.

▪ **Description microscopique**

La tête aspergillaire est strictement unisériée. Les phialides couvrent la moitié supérieure de la vésicule. Les conidies sont petites, de forme sphériques à ellipsoïdales.

▪ **Description macroscopique**

Le diamètre des colonies sur MEA varie entre 58,5 à 63mm. Elles sont planes, de couleur vert très foncé voir grisâtre. Le revers est clair à crème.

Le diamètre des colonies sur CYA à 25°C est de 78mm. Elles présentent un mycélium blanc qui devient pourpre brun avec l'âge et produisent des conidies vert foncé grisâtre. Le revers est incolore à brun pâle avec l'âge. Pas de croissance à 5°C. Les Colonies à 37°C ont une croissance rapide, leur diamètre dépasse 60mm. Elles apparaissent pourpre brun.

Les colonies sur G25N ont un diamètre compris entre 10,5 et 12,5mm, elles sont de couleur crème

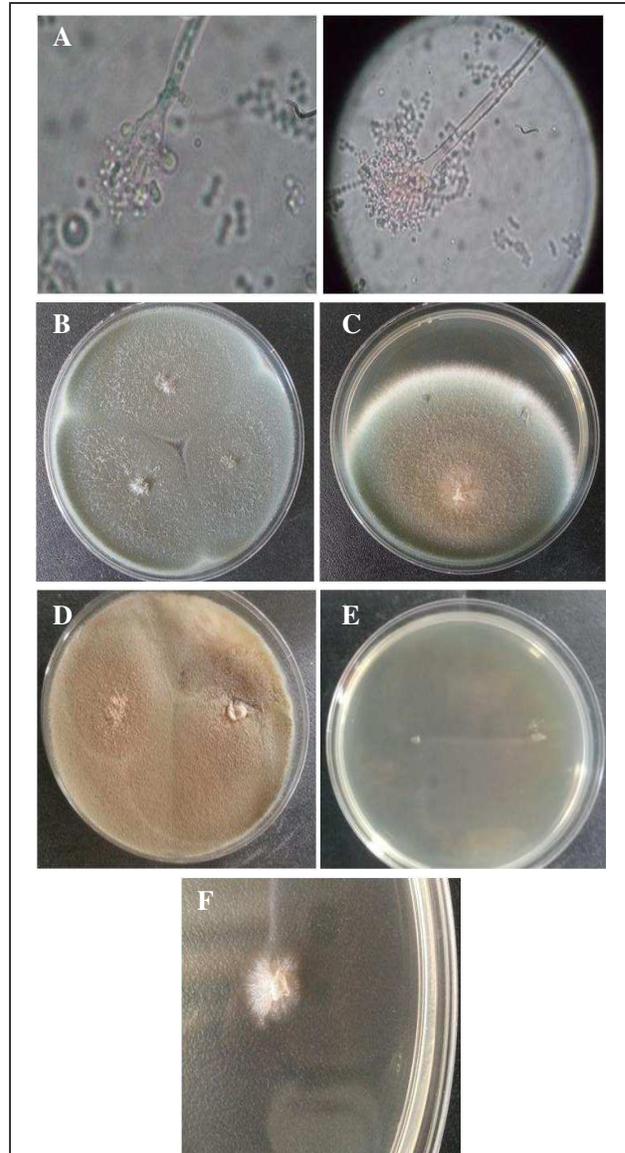


Figure III.7 : *Aspergillus japonicus*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 8 : *Aspergillus nidulans*
(téléomorphe : *Emericella nidulans*)

Emericella est un téléomorphe d'*Aspergillus* caractérisé par la formation de cléistothèces blanc entouré par les cellules Hülle (paroi épaisse réfringente comme cellules *chlamydoconidia*) et produisant des ascospores violets (Pitt et Hocking, 2009).

▪ **Description microscopique**

Les conidiophores naissent à partir de courtes ramifications et portent à la fois les métules et les phialides (tête bisériée). Les conidies produites ont une couleur vert foncé. Nous enregistrons la production des cellules Hülle marron voire rouge brique.

▪ **Description macroscopique**

Les colonies ont sur MEA, un diamètre de 45 à 60mm. Elles sont planes et veloutées avec d'abondantes conidies vert foncé ou violettes. Le mycélium est blanc et le revers est brun pâle.

Les colonies sur CYA ont un diamètre de 43 à 45mm, planes, moyennement dense. Le mycélium de couleur beige foncé est clairsemé avec des cléistothèces blancs ; le revers est pâle. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, les colonies allant jusqu'à 70mm de diamètre (55 à 70mm) sont de couleur beige jaunâtre et présentent de légers traits concentriques en abondance. Le revers est de couleur marron clair.

Les colonies sur G25N ont un diamètre de 7 à 15mm et présentent un mycélium faible ; le revers est pâle.

Sur PDA, les colonies sont de couleur vert moutarde ; elles ont un diamètre qui oscille entre 13 et 16,5mm après 7 jours d'incubation.

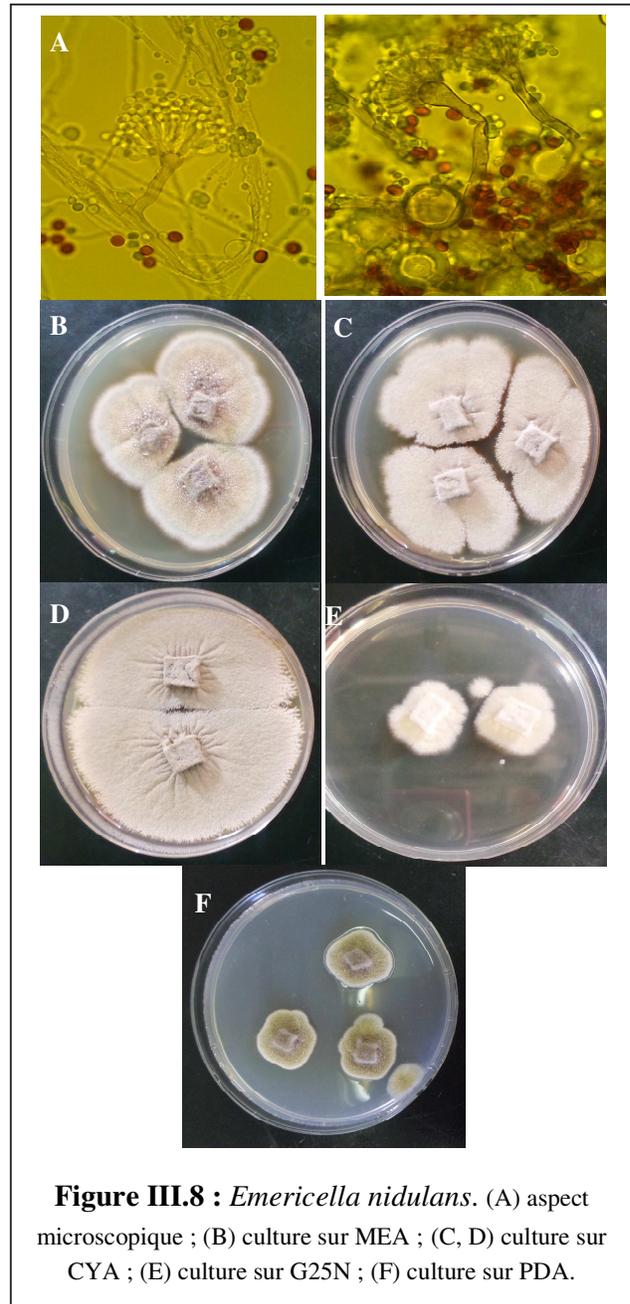


Figure III.8 : *Emericella nidulans*. (A) aspect microscopique ; (B) culture sur MEA ; (C, D) culture sur CYA ; (E) culture sur G25N ; (F) culture sur PDA.

Fiche 9 : *Aspergillus niger*

▪ Description microscopique

Les conidiophores se terminent par une grande vésicule bisériée portant des métules et des phialides sur toute sa surface. Cette dernière est globuleuse de couleur brun foncé. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, elles apparaissent brun foncé à noir avec une paroi rugueuse.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur MEA varient entre 48 à 50,5mm de diamètre ; généralement, elles sont plus petites que les colonies sur CYA. Elles ont un aspect de velours, blanches cotonneuses au départ, devenant poudreuses avec l'apparition de spores noires charbon. Le revers est blanc.

Les colonies sur CYA à 25 et à 37°C ont un diamètre de 55 à 60mm voire plus couvrant ainsi, l'ensemble de la boîte de Pétri, elles sont plates, veloutées, de couleur brun foncé à noir et leur revers est pâle. Pas de croissance à 5°C. Des traits concentriques sont visibles sur les colonies sur les deux milieux MEA et CYA.

Les colonies sur G25N atteignent 30 à 33,5mm de diamètre, elles sont veloutées, blanches à jaune pâle au centre avec un revers pâle.

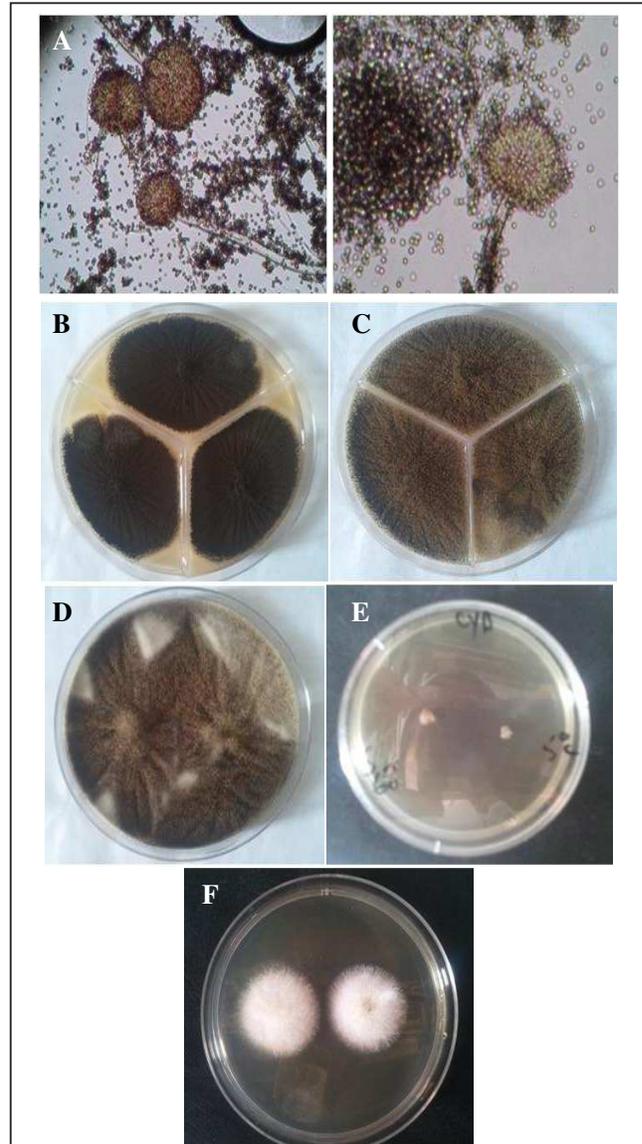


Figure III.9 : *Aspergillus niger*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N

Fiche 10 : *Aspergillus niveus*

▪ Description microscopique

Le conidiophore se renfle à son extrémité terminale formant une petite vésicule légèrement allongée. A partir de cette vésicule hémisphérique se forment des phialides portées par des métules qui sont formées sur les deux tiers de la tête aspergillaire.

▪ Description macroscopique

Sur MEA, les colonies atteignent un diamètre moyen de 38mm. Elles sont planes et présentent une texture granuleuse avec des spores vertes. Le thalle est de couleur crème.

Sur CYA à 25°C, *A. niveus* présente des colonies de 19 à 21,5mm, blanches à crèmes avec un centre jaune clair et un thalle plane. A 5°C, elle ne croit pas et à 37°C la colonie est à thalle blanc atteignant un diamètre de 10 à 13mm.

Sur G25N, les colonies présentent un diamètre de 31,5 à 34,5mm, planes de couleur blanche.

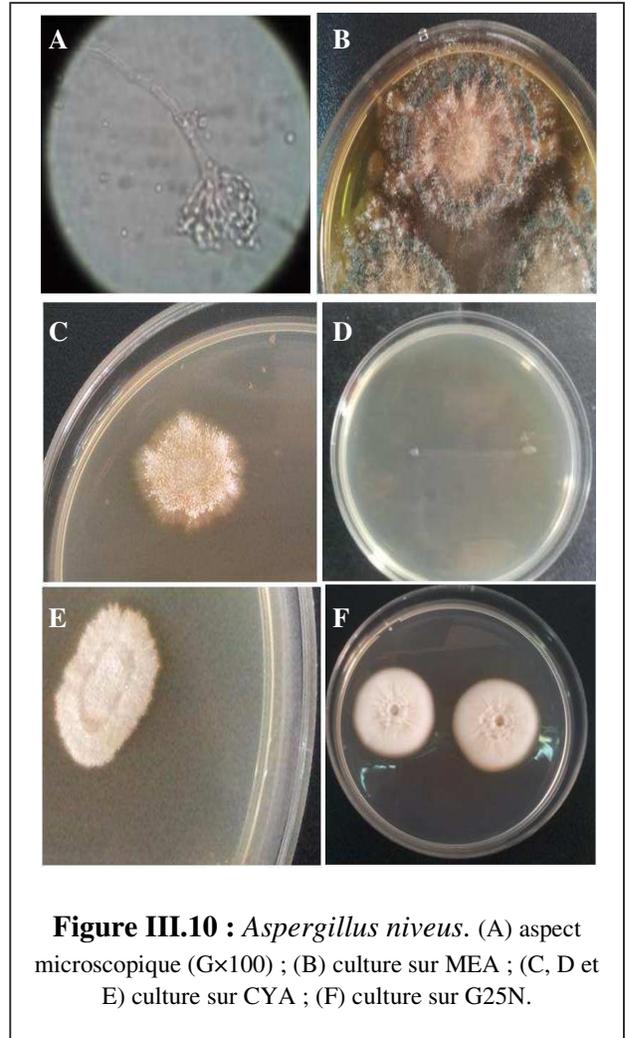


Figure III.10 : *Aspergillus niveus*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 11 : *Aspergillus oryzae*

▪ Description microscopique

Aspergillus oryzae possède une petite tête conidienne bisériée qui produit des conidies globuleuses jaunes à paroi lisses.

▪ Description macroscopique

Sur MEA et CYA, les colonies ont un aspect cotonneux très dense, de couleur blanche clairsemé d'un jaune très pâle. Elles atteignent entre 37,5 et 50mm de diamètre. A 37°C, les colonies sont plus petites, de couleur jaune moutarde et présentent de légers traits concentriques. Leurs revers est blanc. Notons que cette espèce ne croit pas à 5°C.

De même, sur PDA et G25N, les colonies ont un aspect cotonneux, de couleur blanche. Leur diamètre moyen est de 23mm sur PDA et 12mm sur G25N après 7 jours d'incubation à 25°C.

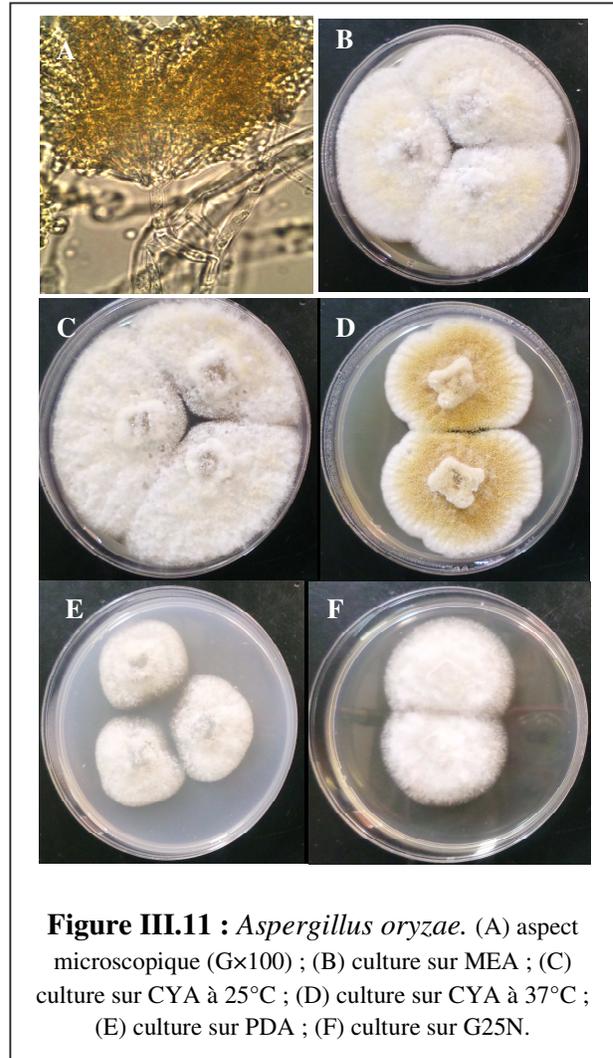


Figure III.11 : *Aspergillus oryzae*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur CYA à 37°C ; (E) culture sur PDA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 12 : *Aspergillus parasiticus*

▪ Description microscopique

Les conidiophores formés à partir de longues hyphes, portent des vésicules sphériques sur plus des trois quarts de leur surface. La tête aspergillière de cette espèce est unisériée et produit de grandes conidies globulaires verruqueuses.

▪ Description macroscopique

Les colonies ont sur MEA, un diamètre qui oscille entre 57,5 et 60mm. Elles sont denses, de couleur vert jaunâtre devenant vert olive foncé avec l'âge.

Les colonies sur CYA atteignent 57,5 à 60mm de diamètre ; elles sont planes, denses et veloutées. Le mycélium est de couleur jaune très vif puis devient vert olive avec l'âge. Les spores sont très abondantes, de couleur vert jaunâtre foncé. Le revers est incolore ou brun. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, les colonies couvrent la totalité de la surface de la boîte de Pétri, et sont semblables aux colonies à 25°C mais parfois, avec des conidies vert plus foncé ; leur revers est pâle. Quelques souches peuvent produire des sclérotés marron clair.

Les colonies sur G25N ont un diamètre de 24,5 à 35,5mm. Le mycélium blanc à jaune est faible et veloutée ; après 14jrs d'incubation, elles ressemblent à celles cultivées sur CYA. Le revers est incolore.

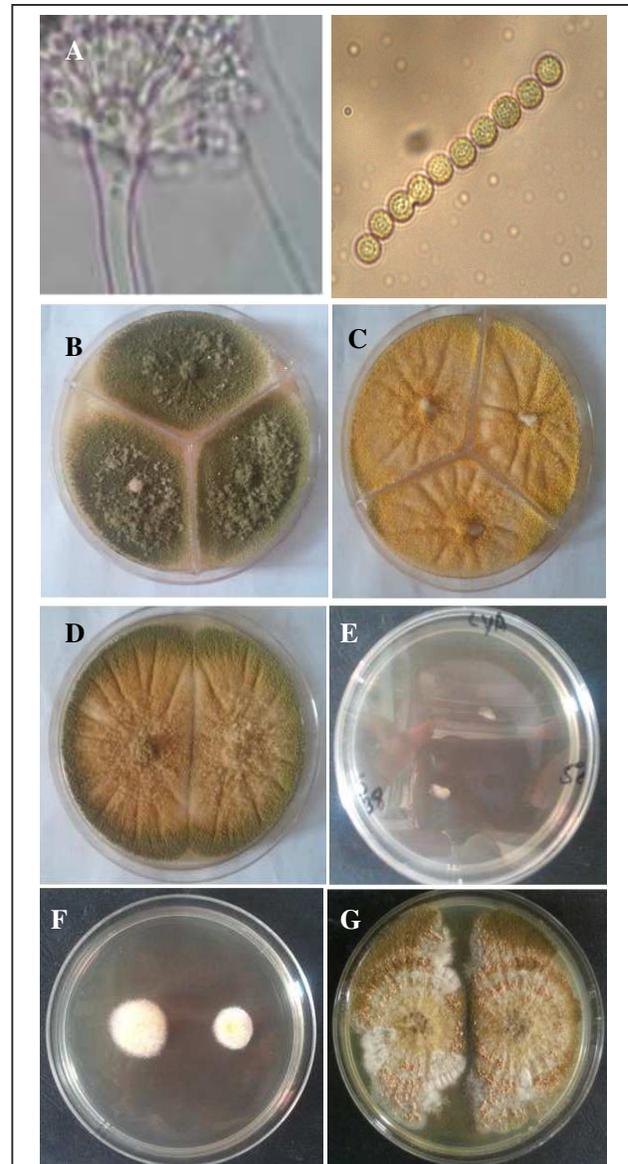


Figure III.12 : *Aspergillus parasiticus*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N ; (G) sclérotés sur CYA à 37°C.

Fiche 13 : *Aspergillus sydowii*

▪ Description microscopique

A. sydowii présente une tête aspergillière sub-globuleuse bisériée, elle produit des conidies globuleuses échinulées. Les métules et les phialides couvrent les deux tiers de la vésicule conidienne.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur MEA sont d'un diamètre de 30 à 34,5mm, elles sont planes, denses, légèrement floconneuses donnant un aspect de velours avec des traits concentriques bien visibles. Le mycélium est blanc devenant bleu foncé avec la production d'exsudats marron orangé, leur revers est beige.

Sur CYA à 25°C, les colonies d'*A. sydowii* ont le même aspect que celles se développant sur MEA. A 5°C cette espèce ne croît pas et à 37°C elle atteint 11 à 15mm de diamètre, ayant une couleur gris.

Sur G25N, les colonies ont un diamètre moyen de 25mm. Elles sont planes, de couleur blanche avec un revers blanc.

Sur PDA, les colonies sont planes et veloutées, de couleur bleu très foncé grisâtre. Elles présentent un diamètre qui oscille entre 11,5 et 14mm.

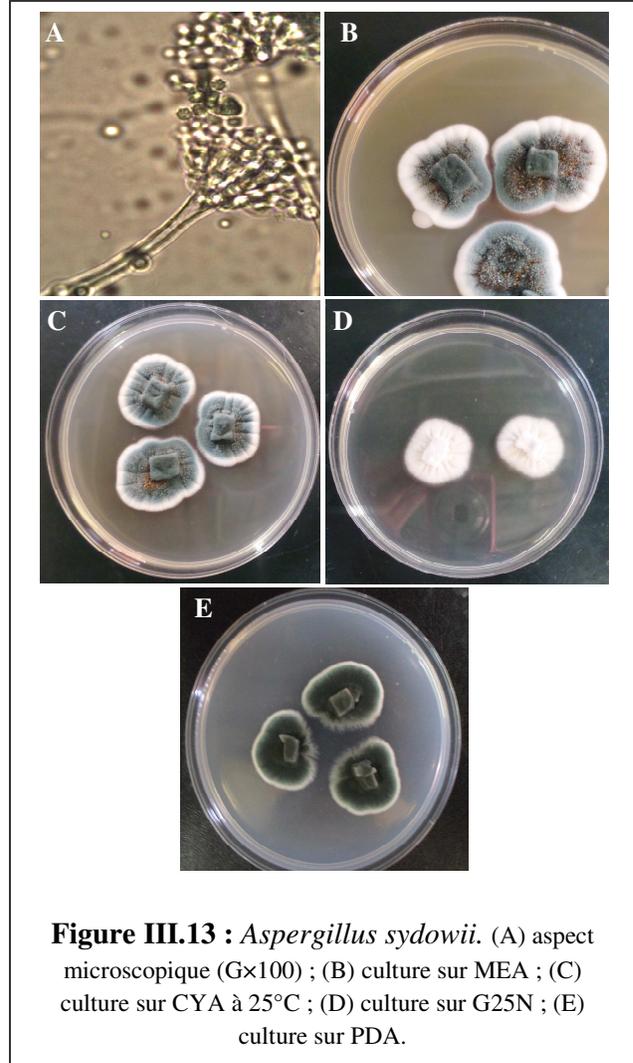


Figure III.13 : *Aspergillus sydowii*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur G25N ; (E) culture sur PDA.

Fiche 14 : *Aspergillus terreus* (Aspect 1)

- **Description microscopique**

Les conidiophores se terminent avec des vésicules cylindriques bisériées comportant des métules sur les deux tiers de leur surface. Les conidies sont très petites, de forme sphérique et à paroi lisse.

- **Description macroscopique**

Les colonies sur MEA présentent un diamètre qui varie entre 44 et 50mm, elles sont très denses. Le mycélium est blanc avec des conidies bruns rosé pâle ou bruns cannelle.

Les colonies sur CYA atteignent 51 à 60mm de diamètre, ridées et veloutées. Leur mycélium est blanc jaunâtre au centre devenant brun cannelle avec l'âge. Les conidies sont de couleur jaune claire et le revers est pâle. Pas de croissance à 5°C. A 37°C, elles atteignent 50 à 70mm de diamètre. Leur apparence est similaire à celles sur CYA à 25°C.

Sur G25N, elles atteignent entre 39 et 44,5mm de diamètre. Elles sont planes, irrégulièrement ridée et éparse, de couleur beige.

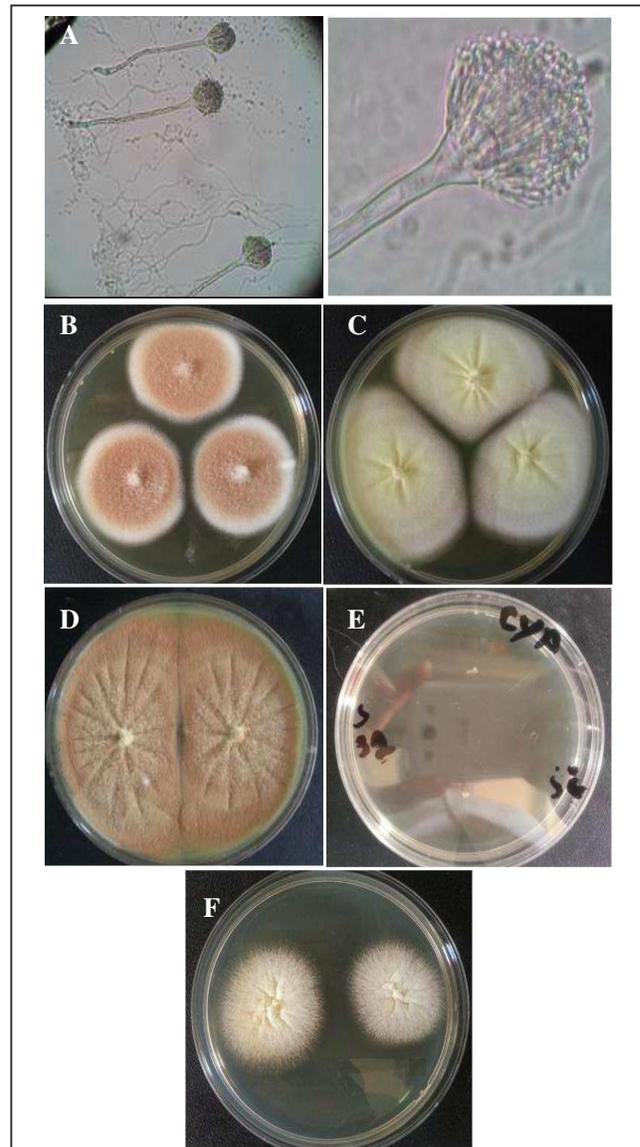


Figure III.14 : *Aspergillus terreus*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 15 : *Aspergillus terreus* (Aspect 2)▪ **Description microscopique**

Les conidiophores sont bruns cannelle, se terminent par des vésicules sphériques, fertiles sur la quasi-totalité de leur surface. Elles portent à la fois les métules et les phialides. Les conidies brunes sont sphériques à sub-sphériques.

▪ **Description macroscopique**

Les colonies sur MEA atteignent une moyenne de 39mm de diamètre. Elles sont planes, relativement denses et veloutées. Le mycélium blanc dont la production des conidies est abondante, présente une couleur marron cannelle. Le revers est orange pâle à orange brun avec l'âge.

Les colonies sur CYA, ont un diamètre qui varie entre 39,5 et 41mm. Elles sont planes, ridées et floconneuses. Le mycélium est blanc à jaune pâle. Les conidies sont modérées, de couleur jaune grisâtre. Le revers est pâle. A 5°C il y a une germination et la formation de microconidies de 9 à 10mm de diamètre. A 37°C, les colonies dépassent 60mm de diamètre et présentent le même aspect que celles à 25°C.

Sur G25N, elles sont de 13,5 à 19mm de diamètre, planes et blanches avec un revers incolore.

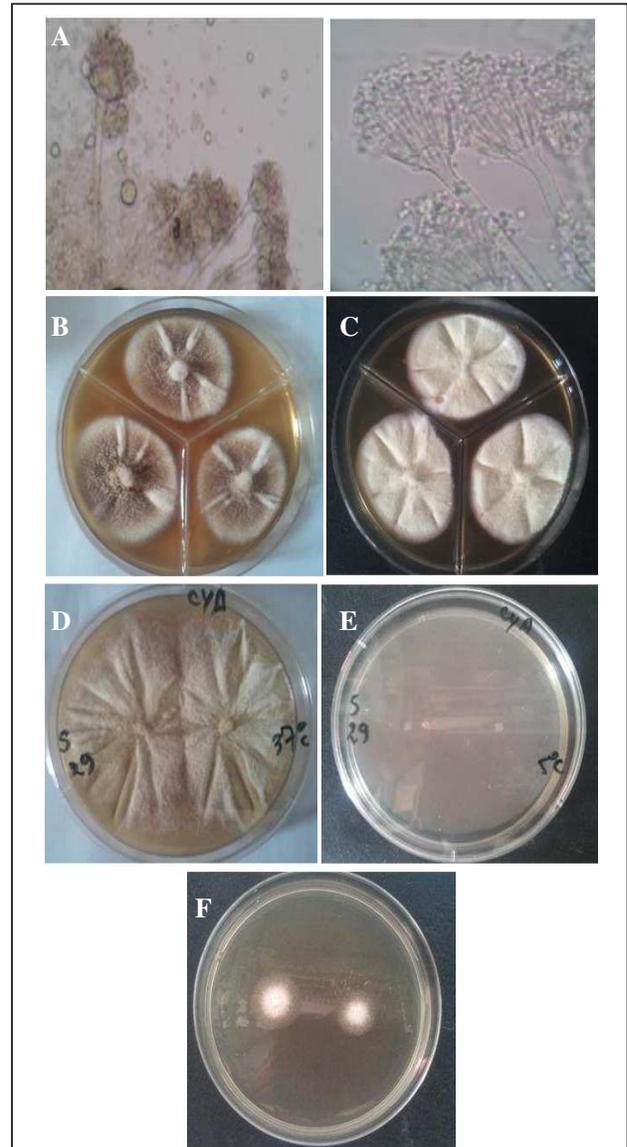


Figure III.15 : *Aspergillus terreus*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 16 : *Aspergillus ustus*

▪ Description microscopique

Le conidiophore se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule sphérique. A partir de la vésicule se forment des phialides par l'intermédiaire de métules. Les phialides forment des conidies unicellulaires, basipétales disposées en chaînettes.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur MEA, atteignent un diamètre allant de 31 à 33,5mm. Elles présentent un mycélium plane et dense, de couleur brun grisâtre avec des lignes concentriques bien marquées et un cercle noir. Leur centre est légèrement surélevé.

Leur diamètre atteint, sur CYA à 25°C, 35 à 39,5mm après 7jrs d'incubation. Elles présentent une couleur marron grisâtre. Elles sont clairsemées de spores grises brunâtre. A 37°C, les colonies présentent le même aspect que celui des colonies incubées à 25°C mais avec un diamètre dépassant 50mm. A 5°C, nous notons la germination des spores.

Sur G25N, les colonies sont blanches avec des conidies jaunes brunâtre denses. Elles présentent des lignes concentriques marron bien marquées. Elles ont un diamètre allant de 44 à 46mm après 14jrs d'incubation.

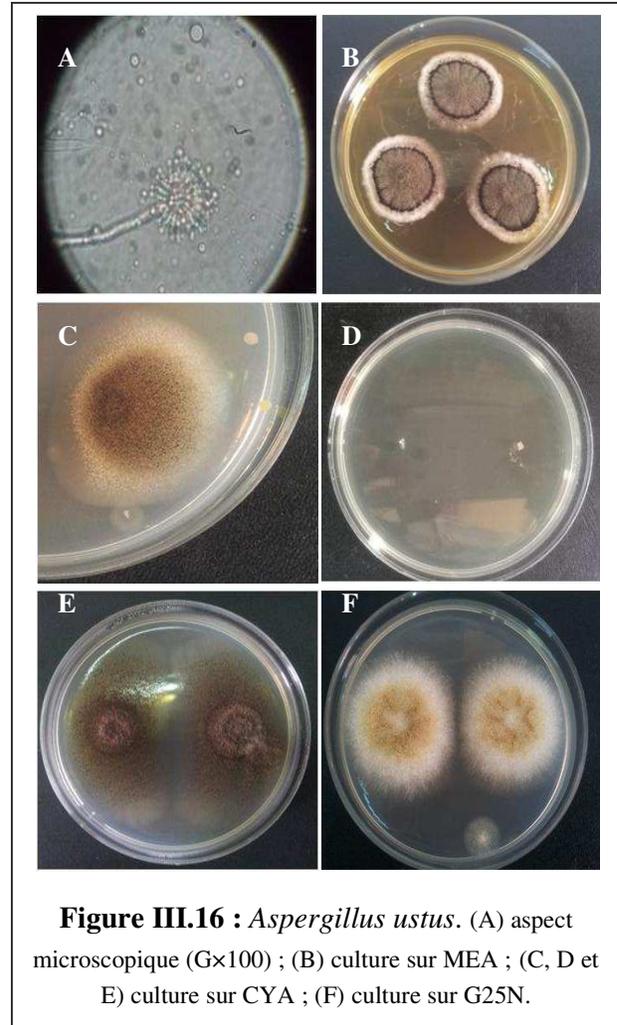


Figure III.16 : *Aspergillus ustus*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 17 : *Cladosporium cladosporioides*▪ **Description microscopique**

Les conidies sont à paroi épaisse, de couleur brun pâle olive. Les plus grandes ne sont pas cloisonnées ou individuellement cloisonnées, à paroi lisse ; alors que les petites ne sont pas cloisonnées, de forme ellipsoïdale à apiculée avec des parois lisses à finement rugueuse.

▪ **Description macroscopique**

Les colonies sur CYA et MEA atteignent 25 à 40mm de diamètre, faible et denses, légèrement ridées, veloutées en surface et légèrement floconneuses. Elles sont de couleur vert olive ; le revers est gris bleuâtre voire noir. A 5°C, elles ne dépassent pas 2mm de diamètre. Pas de croissance à 37°C

Les colonies sur G25N, atteignent 5 à 12mm de diamètre. Elles sont légèrement bombées au centre, veloutée, de couleur similaire à celle sur CYA à 25°C ; le revers est noir bleuâtre.

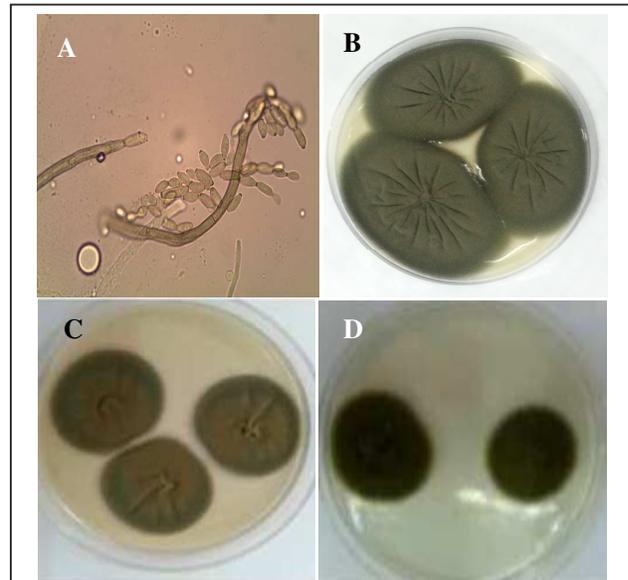


Figure III.17 : *Cladosporium cladosporioides*.
 (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA
 ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur G25N

Fiche 18 : *Cladosporium herbarum*

▪ Description microscopique

La structure des conidiophores est faiblement et irrégulièrement ramifiées, ils sont dendritiques, portées sur de longs stipes sombres. Les conidies ellipsoïdales à cylindroïdes, présentent des extrémités parfois irrégulières en raison de cicatrices de bourgeon, elles ne sont pas cloisonnées à l'exception des grandes conidies qui présentent une à deux cloisons. Elles sont brunes pâle avec des parois rugueuses.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA et MEA atteignent 18 à 32mm de diamètre. Elles sont veloutées à floconneuses, plates, ridées et de couleur olive avec un revers gris olive à vert foncé grisâtre. A 5°C, les colonies atteignent 1 à 2mm de diamètre. Pas de croissance à 37°C.

Les colonies sur G25N sont de 5 à 10mm de diamètre, elles sont clairsemées à denses et profondes, de couleur légèrement plus pâle que celles sur CYA.

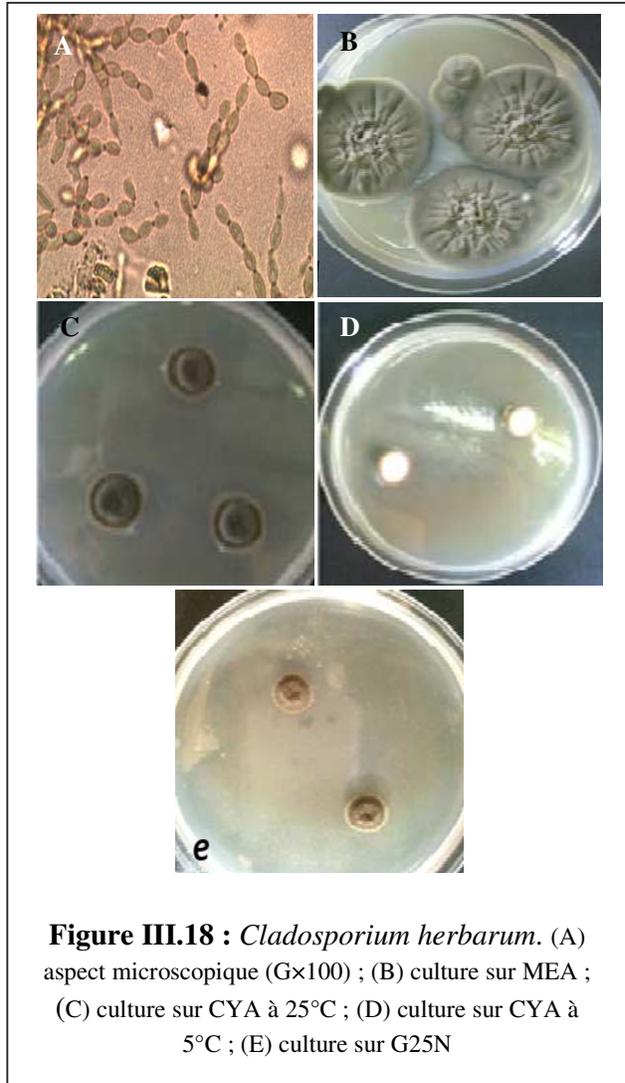


Figure III.18 : *Cladosporium herbarum*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur CYA à 5°C ; (E) culture sur G25N

Fiche 19 : *Fusarium equiseti* var. *compactum*

▪ **Description microscopique**

Les macro-conidies de cette espèce sont bien distinctes, longues et visiblement incurvées présentant 3 à 7 cloisons (en moyenne 5). La cellule basale se présente sous forme de pied et la cellule apicale est très longue et bien courbée. Les micro-conidies sont absentes. Les chlamydo-conidies sont abondantes et naissent en chaîne au niveau du thalle, elles ont une paroi épaisse. Le thalle est cloisonné.

▪ **Description macroscopique**

Sur le milieu CYA, PDA et/ou MEA à 25°C, cette espèce croit rapidement atteignant en moyenne 44 à 50mm de diamètre voire envahissant toute la surface de la boîte de Pétri. Elle présente un mycélium blanc qui devient brun très pâle avec l'âge, dense et floconneux. A 37°C absence de croissance et à 5°C, nous enregistrons la croissance de colonies de 13mm de diamètre en moyenne après 15jrs d'incubation. Le revers est incolore sur les trois milieux.

Sur DCPA, les colonies paraissent moins denses, de couleur saumon pâle et d'un revers incolore.

Sur G25N, les colonies ont une croissance lente, elles atteignent moyennement, 15mm de diamètre après 15jrs d'incubation.

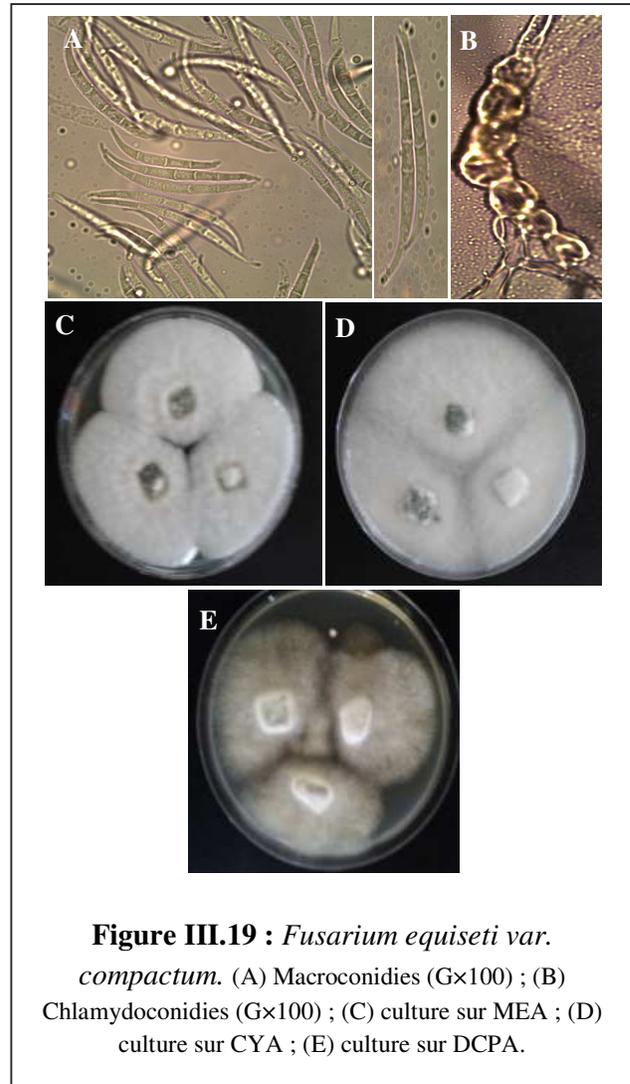


Figure III.19 : *Fusarium equiseti* var. *compactum*. (A) Macroconidies (Gx100) ; (B) Chlamydoconidies (Gx100) ; (C) culture sur MEA ; (D) culture sur CYA ; (E) culture sur DCPA.

Fiche 20 : *Fusarium graminearum*

▪ Description microscopique

F. graminearum ne produit que les macro-conidies. Ces dernières ont un aspect fusiforme, droit à légèrement courbé. La cellule apicale ou terminale est longue et pointue et la cellule basale est en forme de pied. Elles ont moyennement, 5 cloisons (entre 3 et 7 septa).

▪ Description macroscopique

Sur CYA, *F. graminearum* croit sur toute la surface de la boîte de Pétri, le thalle est dense et floconneux, d'une couleur jaune pâle, et un revers pâle. A 5°C, cette espèce atteint un diamètre de 15 à 30mm après 14jrs d'incubation et ne croit pas à 37°C.

Sur MEA, elle croit sur toute la surface de la boîte de Pétri, le mycélium est dense et très floconneux, de couleur variée : rose, grenat à rubis avec un centre grenat brun et un revers orange brunâtre à jaune brunâtre parfois plus pâle sur les marges.

La colonie croit moins rapidement sur le milieu G25N en atteignant 46 à 50mm de diamètre après 14jrs d'incubation.

Sur PDA, la colonie de *F. graminearum* d'un aspect floconneux et dense, croit sur toute la surface de la boîte de Pétri. Le mycélium est d'une couleur rose à grenat brunâtre au centre avec des sporodochies jaunes. Le revers est de couleur rubis à rubis foncé au centre.

Sur milieu DCPA, la colonie d'une couleur saumon très pâle est floconneuse avec un revers pâle.

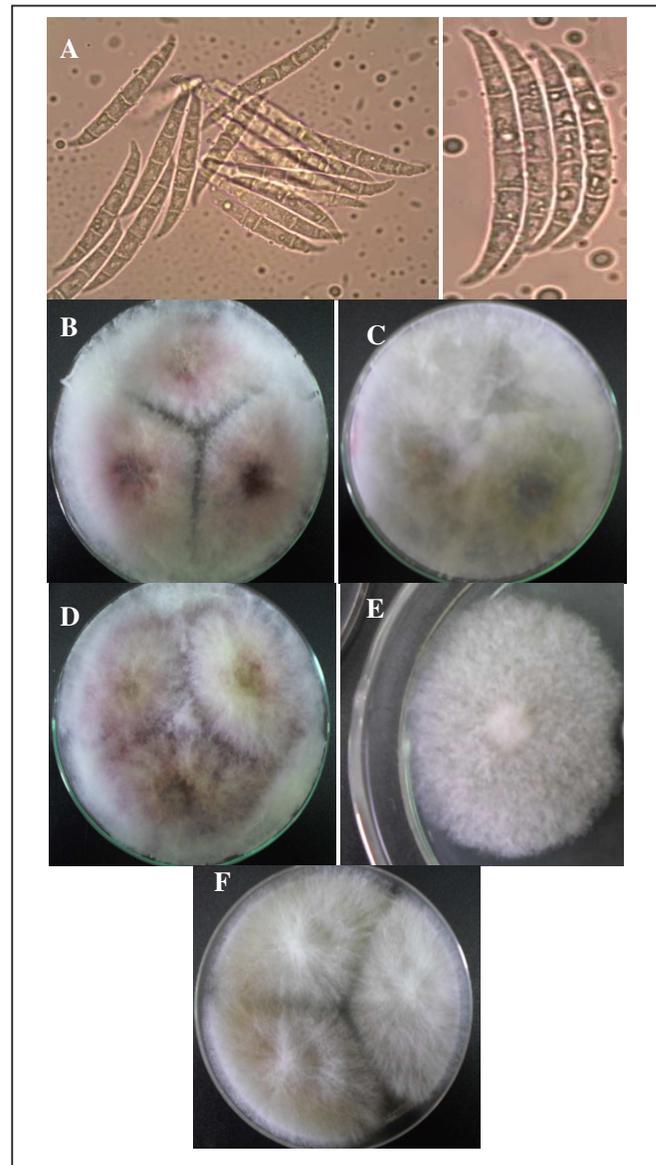


Figure III.20a: *Fusarium graminearum* (Aspect 1). (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur PDA ; (E) culture sur G25N ; (F) culture sur DCPA.

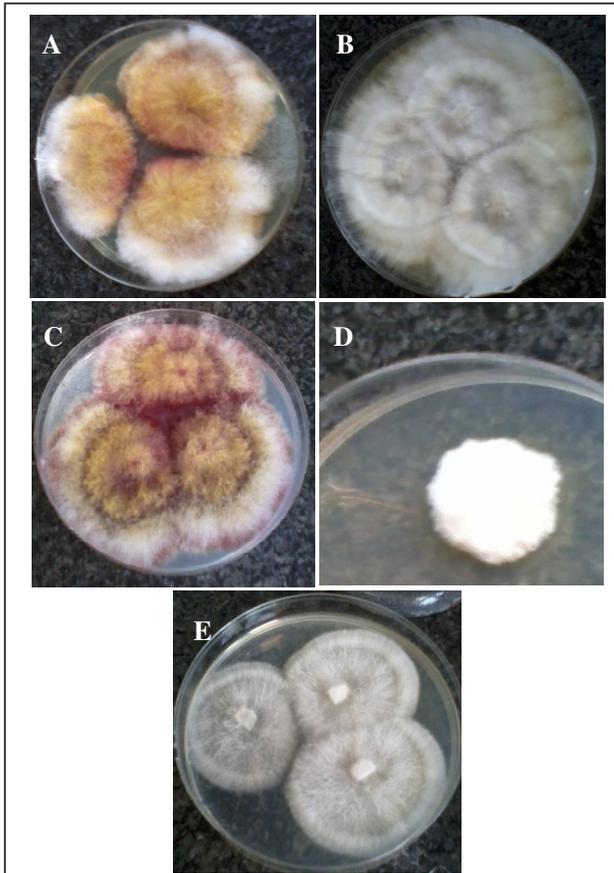


Figure III.20b: *Fusarium graminearum* (Aspect 2). (A) culture sur MEA ; (B) culture sur CYA ; (C) culture sur PDA ; (D) culture sur G25N ; (E) culture sur DCPA.

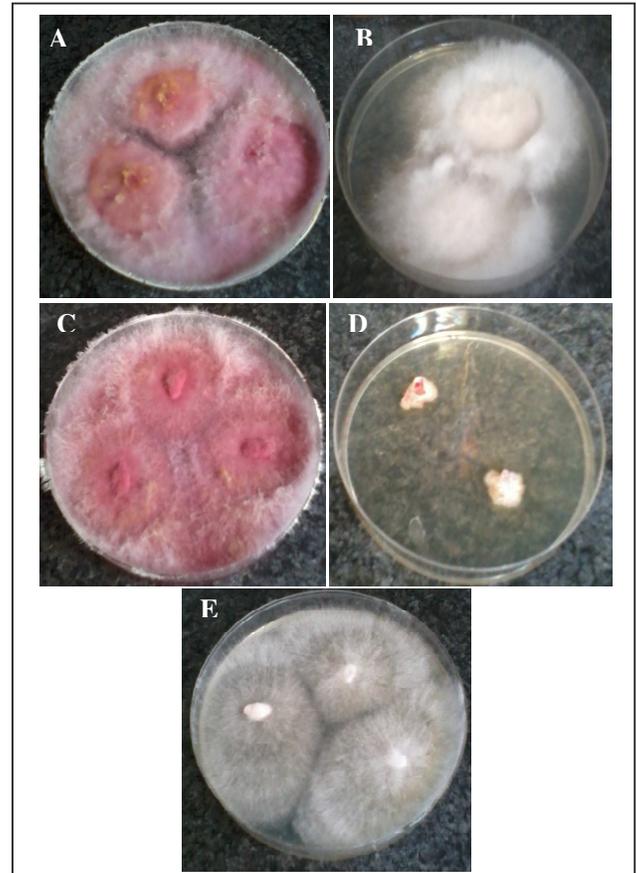


Figure III.20c: *Fusarium graminearum* (Aspect 3). (A) culture sur MEA ; (B) culture sur CYA ; (C) culture sur PDA ; (D) culture sur G25N ; (E) culture sur DCPA.

Fiche 21 : *Fusarium oxysporum*

▪ Description microscopique

Les micro-conidies sont très abondantes, fusiformes produites en fausses têtes sur des monophialides courtes et robustes.

▪ Description macroscopique

F. oxysporum présente sur CYA une colonie floconneuse et moins dense, de couleur blanche grisâtre et un revers pâle. A 5°C, elle germe et forme des micro-colonies ; pendant qu'elle atteint 5 à 15mm de diamètre à 37°C après 7jrs d'incubation.

Sur MEA, la colonie présente un thalle floconneux, blanc grisâtre avec un revers jaune et des rayons pourpres foncés. Un pigment jeune diffuse sur la gélose.

Sur G25N, la colonie atteint un diamètre de 12 à 16mm après 7 jrs d'incubation et 33 à 35mm après 14jrs d'incubation.

Sur PDA, la colonie est blanche à violet pâle, dense et floconneuse et le revers est violet très foncé au centre.

Sur DCPA, la colonie est très basse avec un revers transparent.

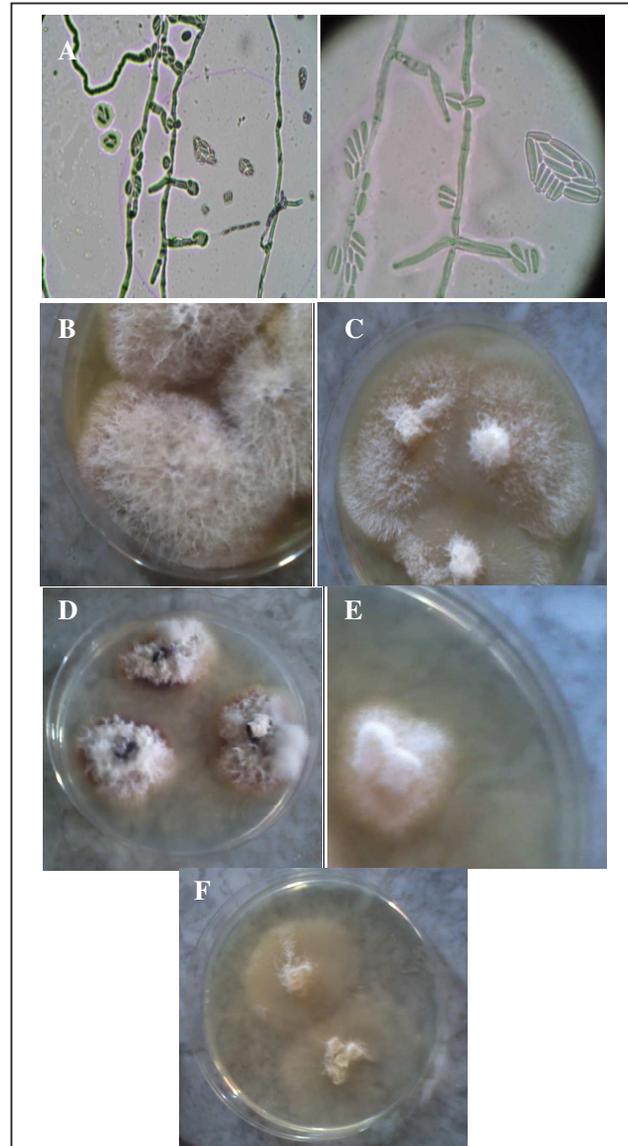


Figure III.21 : *Fusarium oxysporum*. (A) aspect microscopique (micro-conidies Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur PDA ; (E) culture sur G25N ; (F) culture sur DCPA.

Fiche 22 : *Fusarium poae*

▪ Description microscopique

Les macro-conidies sont généralement courtes avec 3 cloisons et parfois 5 cloisons. Elles sont légèrement courbées avec une cellule basale en forme de pied et une cellule apicale courbée. Les micro-conidies sont très abondantes, produites en masse. Elles sont napiforme avec une papille et entre 0 et 1 cloison. Sur le mycélium, elles se regroupent en grappes sur de courtes monophtialides.

▪ Description macroscopique

Sur milieu CYA à 25°C, les colonies présentent un mycélium blanc qui couvre toute la boîte de Pétri. A 5°C, cette espèce forme des colonies de 7mm de diamètre. Par contre, elle ne croît pas à 37°C.

Les colonies sur MEA sont plus denses, de couleur blanche à rose pâle avec un revers pâle. Elles atteignent 60mm de diamètre voire plus.

Sur PDA, les colonies croient moins rapidement pour atteindre un diamètre moyen de 61mm après 7jrs d'incubation. Le mycélium est dense, floconneux, de couleur rose pâle.

Sur DCPA, les colonies sont moins denses de couleur saumon très pâle et un revers pâle. Elles atteignent 50 à 55mm de diamètre après 7jrs d'incubation.

Sur G25N, cette espèce présente une vitesse de croissance trop lente, elle aboutit à 20mm de diamètre après 7jrs d'incubation.

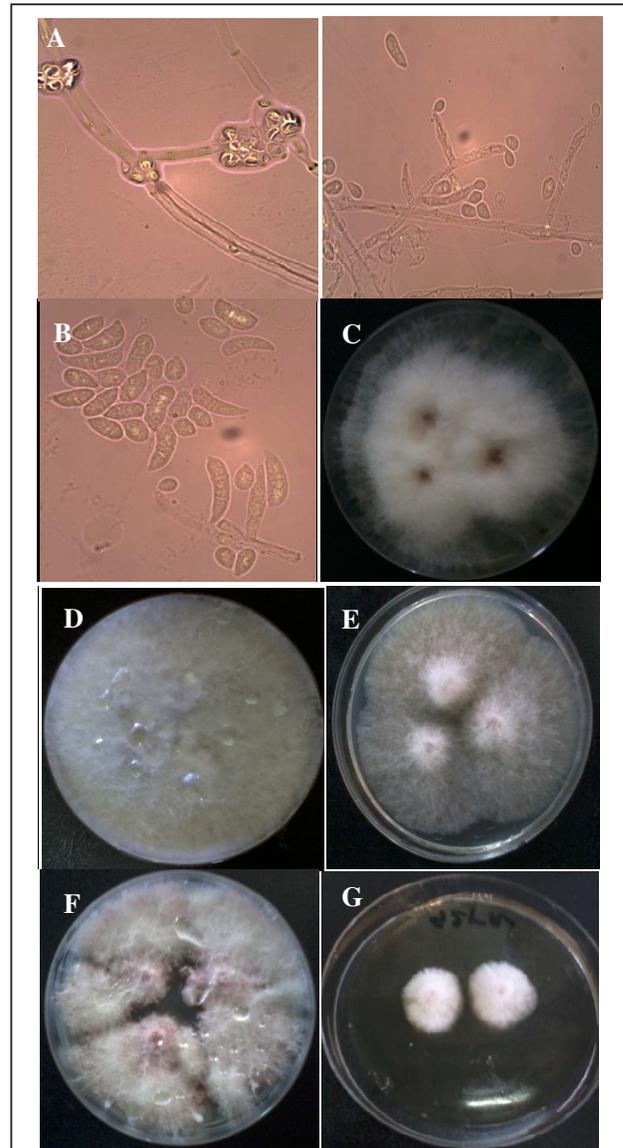


Figure III.22 : *Fusarium poae*. (A) micro-conidies *in situ* (Gx100) ; (B) macro et micro-conidies (Gx100) ; (C) culture sur MEA ; (D) culture sur CYA ; (E) culture sur MEA ; (F) culture sur PDA ; (G) culture sur G25N.

Fiche 23 : *Fusarium solani*

▪ Description microscopique

Les macro-conidies sont robustes avec 5 cloisons en moyenne. La cellule apicale est émoussée et arrondie et la cellule basale arrondie est en forme de pied. Les micro-conidies sont fusiformes. Les chlamydoconidies sont produites en paires

▪ Description macroscopique

La colonie sur CYA, MEA, PDA et DCPA couvre toute la boîte de Pétri. Elle présente une couleur et un revers pâle sur CYA. Au centre, est formée une masse crème de spores. De légers rosâtres exsudats diffusent la gélose. Cette espèce ne croit pas à 5°C et atteint 33 à 39mm de diamètre à 37°C en présentant une couleur crème.

Sur MEA et PDA, le mycélium de la colonie est faible à modérément épais, funiculeux, de couleur violet pâle avec des sporodochies jaunes verdâtre qui virent avec le temps au vert vif. Un exsudat jaune orange diffuse la gélose.

Sur G25N, la colonie est blanche jaunâtre au centre avec un revers pâle.

Sur DCPA, la colonie présente un mycélium clairsemé avec un anneau annulaire au centre et des sporodochies crème. Le revers est jaune pâle.

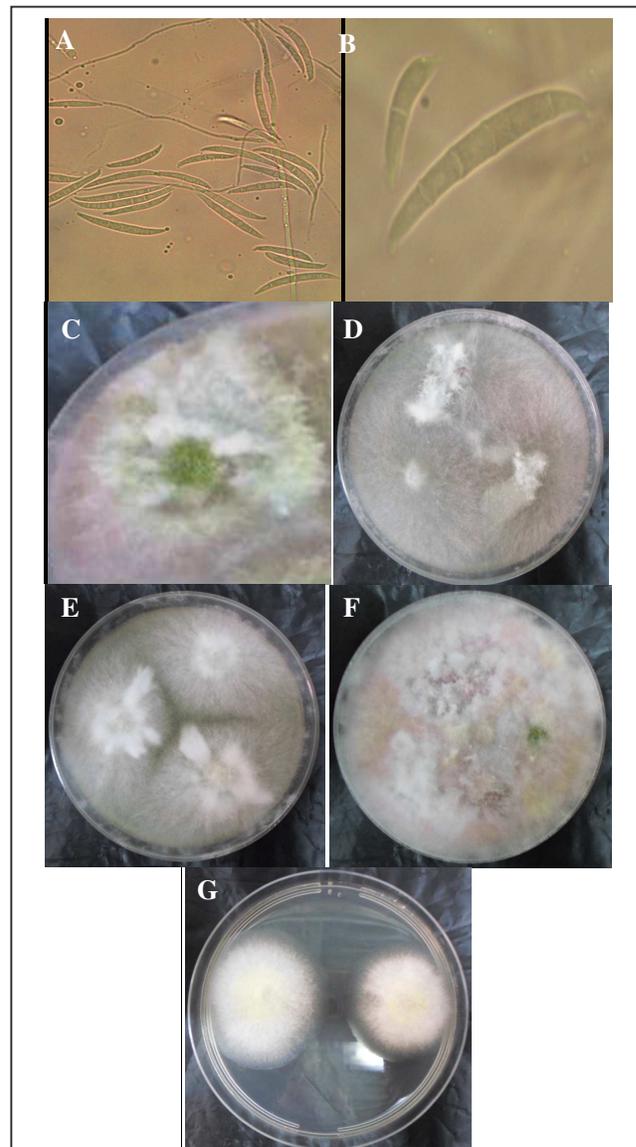


Figure III.23 : *Fusarium solani*. (A) macroconidies (Gx100) ; (B) macro et microconidies (Gx100) ; (C) culture sur MEA ; (D) culture sur CYA ; (E) culture sur DCPA (F) culture sur PDA ; (G) culture sur G25N.

Fiche 24 : *Fusarium subglutinans*▪ **Description microscopique**

Les macroconidies sont légèrement courbées se présentant avec 3 à 5 cloisons. La cellule apicale est pointue et la cellule basale est en forme de pied très peu développé. Les micro-conidies sont produites en abondance sur des mono ou des polyphialides. Elles sont fusiformes avec, au maximum un septum.

▪ **Description macroscopique**

Sur CYA, les colonies couvrent la totalité de la boîte de Pétri, elles sont moins denses, funiculeuses, de couleur rose très pâle avec un revers jaune. A 5°C, nous enregistrons une absence de croissance et à 37°C, il y a formation de micro-colonies de 14mm de diamètre.

Sur MEA, elle présente le même aspect que sur CYA à 25°C mais avec un mycélium plus dense, d'une couleur rose et un revers jaunâtre. Les colonies oscillent entre un diamètre de 46 à 51mm.

Sur DCPA, les colonies sont de couleur saumon pâle atteignant entre 30 et 45mm de diamètre.

Sur G25N, les colonies atteignent en moyenne 12mm de diamètre après 15jrs d'incubation.

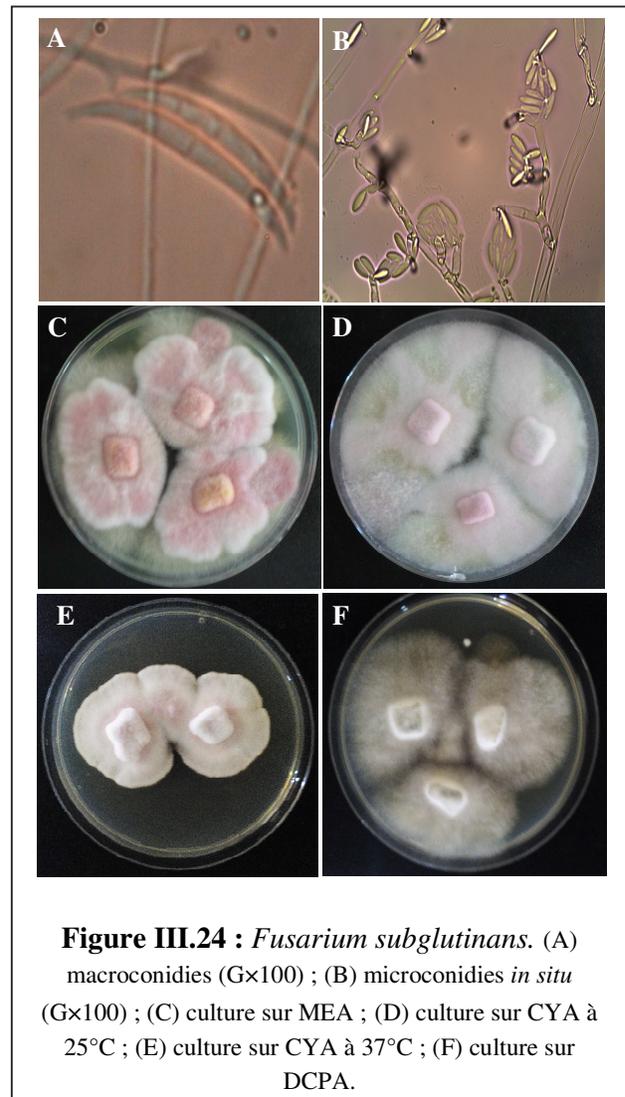


Figure III.24 : *Fusarium subglutinans*. (A) macroconidies (G×100) ; (B) microconidies *in situ* (G×100) ; (C) culture sur MEA ; (D) culture sur CYA à 25°C ; (E) culture sur CYA à 37°C ; (F) culture sur DCPA.

Fiche 25 : *Fusarium verticillioides*▪ **Description microscopique**

Les macro-conidies sont longues et minces, presque droites et à paroi mince. La cellule basale est sous forme de pied. Les micro-conidies sont fusiformes et massues (en fausse tête) produites à partir de longs monophialides

▪ **Description macroscopique**

Les colonies couvrent l'ensemble de la boîte de Pétri, ceci sur les milieux PDA, MEA, CYA et DCPA à 25°C. La colonie présente sur CYA un mycélium faible sur les marges et modérément profond au centre, floconneux d'une couleur blanche à violet pâle après 14jrs d'incubation à 25°C ; le revers présente une pigmentation jaune pâle. A 5°C, la germination est tardive.

Sur MEA, le mycélium d'une couleur saumon pâle, présente le même aspect qu'en milieu CYA avec un revers saumon à orange pâle et brunâtre au centre et une pigmentation jaune pâle qui diffuse la gélose.

Sur G25N, le mycélium est moins dense, blanc avec un revers pâle.

Sur PDA, le mycélium est bas et dense, d'une couleur pastèque au début et vire au violet après 14jrs d'incubation à 25°C, il a un aspect poudreux dû aux micro-conidies ; le revers est saumon pastel brunâtre au centre.

Sur DCPA, le thalle est bas et dense, d'une couleur pâle présentant un

pigment crème à jaune pâle ; le revers est pâle.

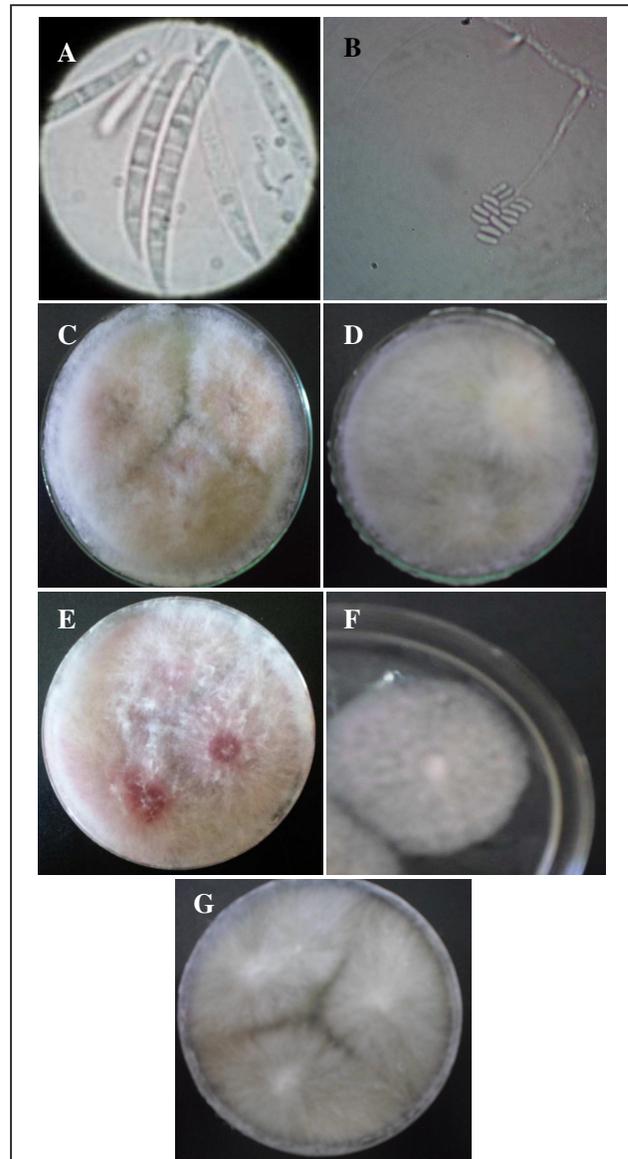


Figure III.25 : *Fusarium verticillioides*. (A) aspect microscopique (macroconidie Gx100) ; (B) microconidies (Gx100). (C) culture sur MEA ; (D) culture sur CYA ; (E) culture sur PDA ; (F) culture sur G25N ; (G) culture sur DCPA.

Fiche 26 : *Penicillium chrysogenum*

▪ Description microscopique

Cette espèce présente des Conidiophores terverticillés avec 1 à 2 branches. Les phialides sont ampulliformes donnant naissance à des conidies subsphériques.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA atteignent 19 à 24mm de diamètre, le mycélium est faible et veloutée présentant des traits concentriques visibles. Il est blanc jaunâtre avec des conidies apparaissant turquoise grisâtres. Des exsudats oranges ou bruns jaunâtre brillants sont produits. Le revers est jaune à jaune brun. A 5°C et à 37°C, il y a la formation de micro-colonies de 3 à 5mm de diamètre.

Les colonies sur MEA ont un diamètre de 27 à 29,5mm, généralement planes et veloutées. Les conidies en nombre modéré, sont de couleur turquoise grisâtre à vert foncé. Le revers est jaune brunâtre.

Les colonies sur G25N sont de 22 à 26mm de diamètre, de couleur beige avec un centre blanc et des traits concentriques visibles. Le revers est de couleur pâle.

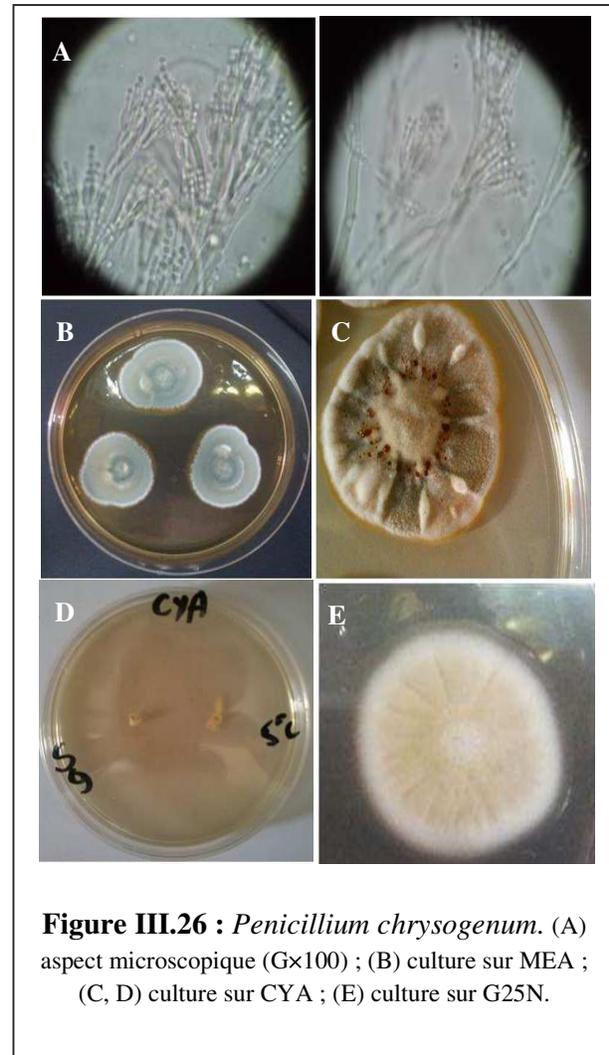


Figure III.26 : *Penicillium chrysogenum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D) culture sur CYA ; (E) culture sur G25N.

Pla
A :
B :
G2

Fiche 27 : *Penicillium citreonigrum*▪ **Description microscopique**

Les conidiophores sont monoverticillés portant 2 à 8 phialides ampulliformes. Les conidies regroupées en chaînes sont sphériques.

▪ **Description macroscopique**

Le diamètre des colonies sur CYA est de 23 à 29,5mm. Leur centre est bombé. Elles sont floconneuses et denses. Le mycélium est blanc à gris jaunâtre et le revers est crème devenant jaune brun avec l'âge. A 5°C, il y a la formation de microconidies de 4 à 5mm de diamètre. A 37°C, nous constatons l'absence de croissance de cette espèce.

Les colonies sur MEA ont un diamètre de 22 à 24,5mm et un centre soulevé. Elles sont floconneuses avec une marge veloutée. Le mycélium est blanc devenant vert grisâtre après la formation des spores. Le revers est jaune grisâtre.

Les colonies sur G25N ont un diamètre de 12 à 15,5mm avec un centre bombé. Le mycélium est blanc et le revers est pâle.

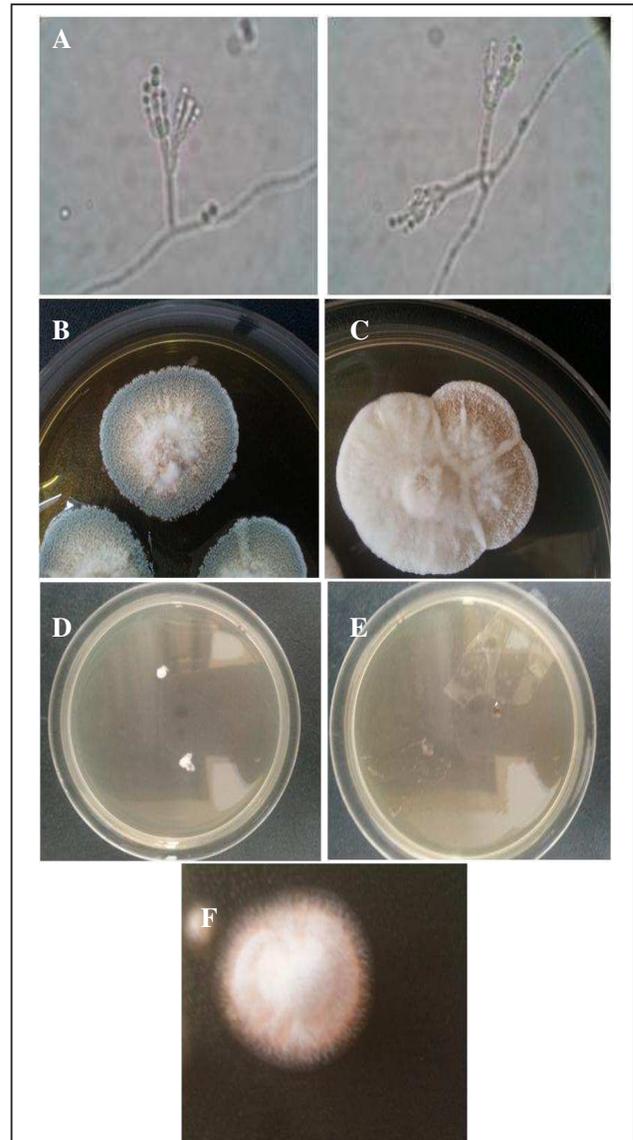


Figure III.27 : *Penicillium citreonigrum*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 28 : *Penicillium digitatum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores sont bi-verticillés irréguliers portant des phialides ampulliformes qui donnent naissance à des conidies cylindriques à paroi lisse.

▪ Description macroscopique

P. digitatum présente sur CYA des colonies de couleur vert grisâtre, planes, veloutées et floconneuses. Elles atteignent un diamètre qui se situe entre 40 et 50mm. Le revers des colonies est blanc. A 5°C et à 37°C, il n'y a pas de croissance.

Sur MEA, les colonies ont le même aspect que celles sur CYA mais de couleur vert bleuâtre, un diamètre moyen de 35mm et un revers beige jaunâtre. Des traits concentriques sont visibles sur les deux milieux.

Sur PDA, les colonies se développent moins rapidement que sur CYA et MEA. Elles atteignent un diamètre qui balance entre 17 et 25mm. Le mycélium présente les mêmes caractéristiques morphologiques citées plus haut.

Sur G25N, nous assistons au développement de colonies marrons claires qui deviennent plus foncées avec l'âge. Les colonies ont un diamètre moyen de 10mm.

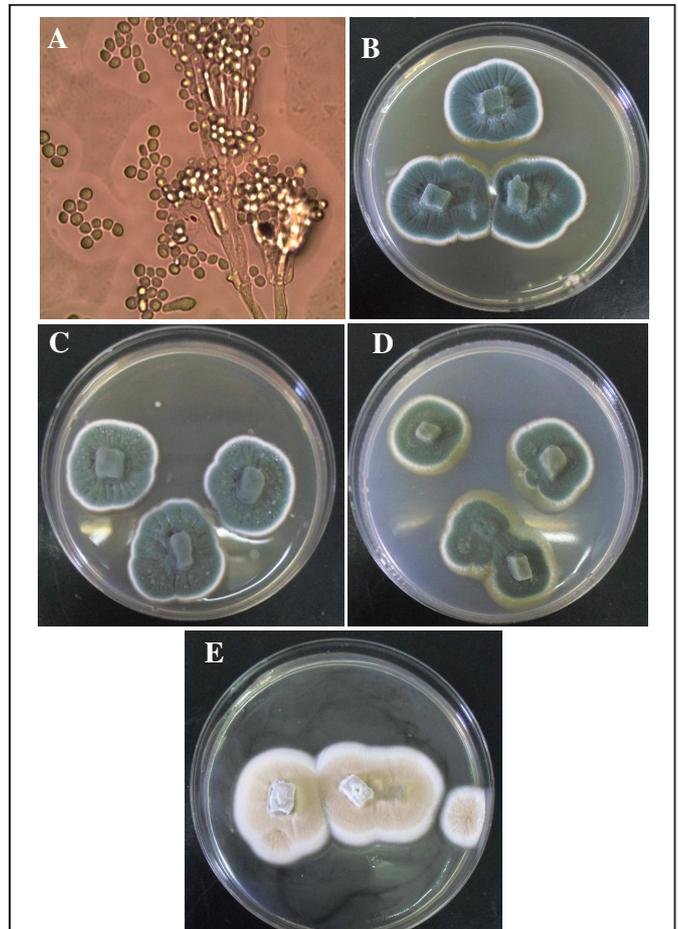


Figure III.28 : *Penicillium digitatum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur PDA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 29 : *Penicillium expansum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores naissent à la surface des hyphes qui portent des pénicilles terminaux terverticillés, mais parfois biverticillés avec une seule ramification. Les phialides sont ampulliformes portant des conidies ellipsoïdales.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA ont un diamètre de 41,5mm en moyenne. Elles sont radiées et surélevées au centre, elles présentent une ou plusieurs bandes annulaires, avec des zones adjacentes veloutées à floconneuses. Le mycélium est jaune clair avec une zone rose claire au centre. Le revers est pâle. Pas de croissance à 37°C ni à 5°C.

Les colonies sur MEA allant de 34,5 à 40mm de diamètre sont planes, veloutées de couleur vert foncé. Nous notons la production d'exsudats jaune à la surface des colonies et un pigment soluble jaune qui diffuse sur la gélose. Le revers est pâle.

Les colonies sur G25N de 28,5mm de diamètre moyen, sont blanches à crèmes, légèrement radiées, denses, veloutées avec un centre surélevé et un revers pâle.

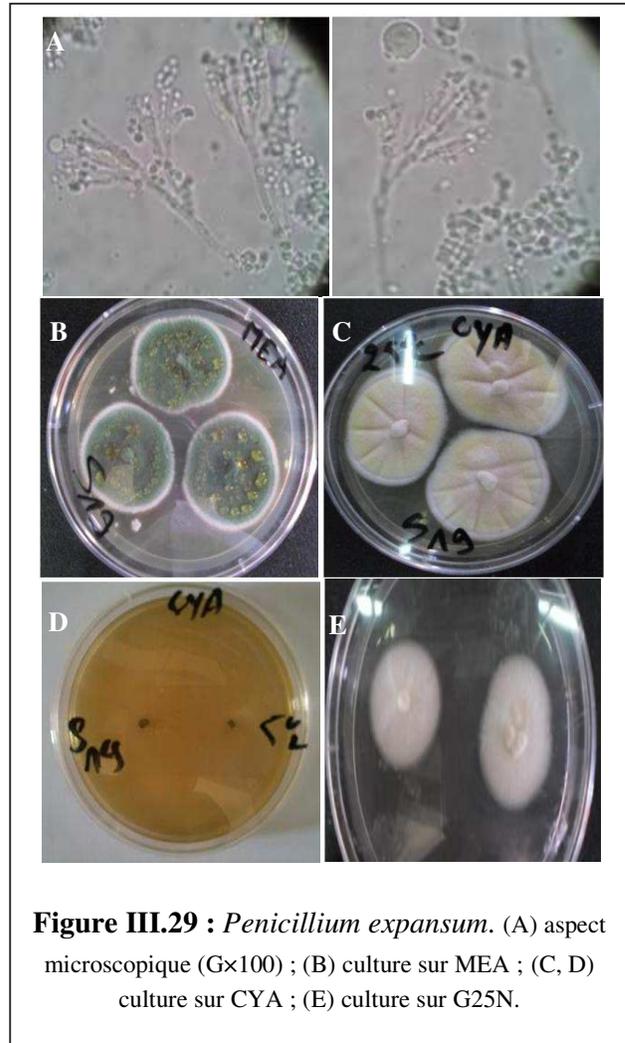


Figure III.29 : *Penicillium expansum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D) culture sur CYA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 30 : *Penicillium fellutanum*

▪ Description microscopique

Cette espèce présente des pénicilles monoverticillés qui portent des phialides larges ampulliformes. Les conidies produites sont ellipsoïdales à paroi lisse.

▪ Description macroscopique

Sur milieu CYA et MEA à 25°C, les colonies atteignent un diamètre de 20 à 27mm. Elles sont de couleur gris souris verdâtre, veloutées et denses avec un revers pâle. Nous remarquons de petites ridules horizontales et verticales. Absence de croissance à 5°C et à 37°C.

Sur PDA, les colonies sont de couleur crème. Elles poussent moins rapidement que sur CYA et MEA (13 à 21mm de diamètre).

Sur G25N, nous observons des colonies de 10 à 11mm de diamètre.

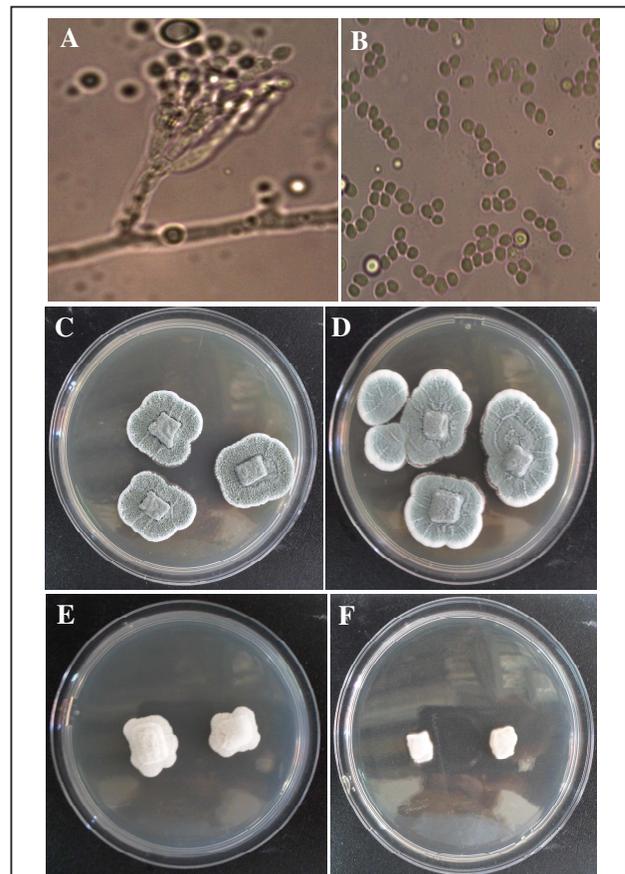


Figure III.30 : *Penicillium fellutanum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) conidies ; (C) culture sur MEA ; (D) culture sur CYA ; (E) culture sur PDA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 31: *Penicillium funiculosum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores portent des pénicilles biverticillés symétriques. Les métules et les phialides sont étroitement plaqués. Ces dernières portent de petites conidies cylindroïde à ellipsoïdales regroupées en de courtes colonnes.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA présentent un diamètre de 28,5 à 31mm. Elles sont planes et veloutées avec un mycélium brun orangé. Les spores modérément abondantes, sont de couleur vert sombre ; le revers est pâle. Pas de germination à 5°C. A 37°C, les colonies de 18mm de diamètre moyen, présentent le même aspect que celui des colonies sur CYA à 25°C mais avec une couleur crème à brun pâle et un revers pâle.

Les colonies sur MEA atteignent 37 à 45mm de diamètre. Le mycélium est funiculeux de couleur bleu turquoise avec un centre marron claire. Le revers est orange brun.

Les colonies sur G25N atteignent 23,5 à 28mm de diamètre. Elles sont planes, funiculeuses et crèmes avec un revers pâle.

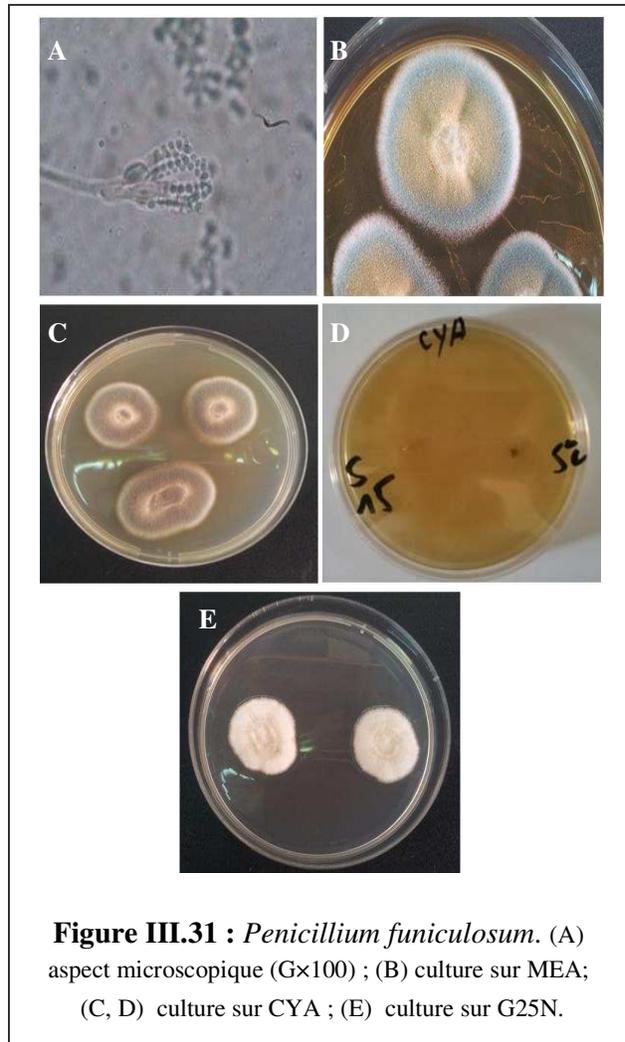


Figure III.31 : *Penicillium funiculosum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA; (C, D) culture sur CYA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 32 : *Penicillium glabrum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores se terminent par un ronflement ornementé par de nombreux phialides ampulliformes monoverticillés. Chaque phialide produit de petites conidies sphériques.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA atteignent 47 à 50mm de diamètre, elles sont planes, modérément sillonnées et veloutées. Le mycélium est de couleur jaunes à crème avec la présence d'un pigment soluble jaune vif produit par certains isolats. Le revers varie d'orange foncé à brun rougeâtre. A 5°C, nous notons la formation de microcolonies de 3 à 6mm de diamètre. Pas de croissance à 37°C.

Les colonies sur MEA atteignent 32,5mm de diamètre. Elles sont veloutées, légèrement sillonnées, vert grisâtre à vert foncé au centre avec un contour blanc. Certains isolats produisent un pigment soluble jaune. Le revers est pâle.

Les colonies sur G25N de 29 à 35mm de diamètre, sont veloutées et blanches.

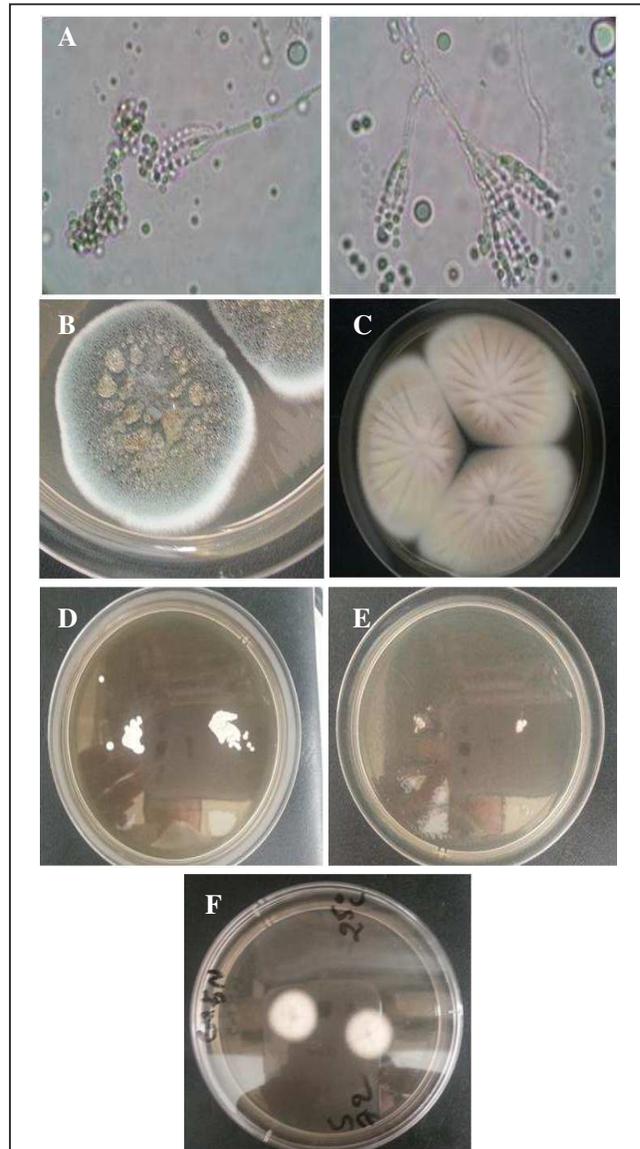


Figure III.32 : *Penicillium glabrum*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N

Fiche 33 : *Penicillium glandicola*

▪ Description microscopique

Les conidiophores produisent des pénicilles biverticillés se disposant symétriquement. Chaque pénicille porte à son extrémité, des phialides minces. Les conidies sont globuleuses.

▪ Description macroscopique

La vitesse de croissance de cette espèce est modérée sur tous les milieux utilisés. En effet, sur milieu CYA et PDA, les colonies atteignent un diamètre moyen de 37mm et 16mm respectivement. Elles sont veloutées, très denses et légèrement bombées avec des lignes concentriques. Leur mycélium est de couleur bleu horizon grisâtre avec des extrémités blanches et un revers beige. Cette espèce ne croit pas à 5°C. A 37°C, nous constatons la formation de micro-colonies de 9mm de diamètre.

Sur MEA, les colonies paraissent plus foncées, planes, denses et veloutées. Leur revers est beige. Elles ont un diamètre qui varie de 24 à 34mm.

Sur G25N par contre, *P. glandicola* donne de petites colonies radiées, blanches voire légèrement crème avec un revers blanc.

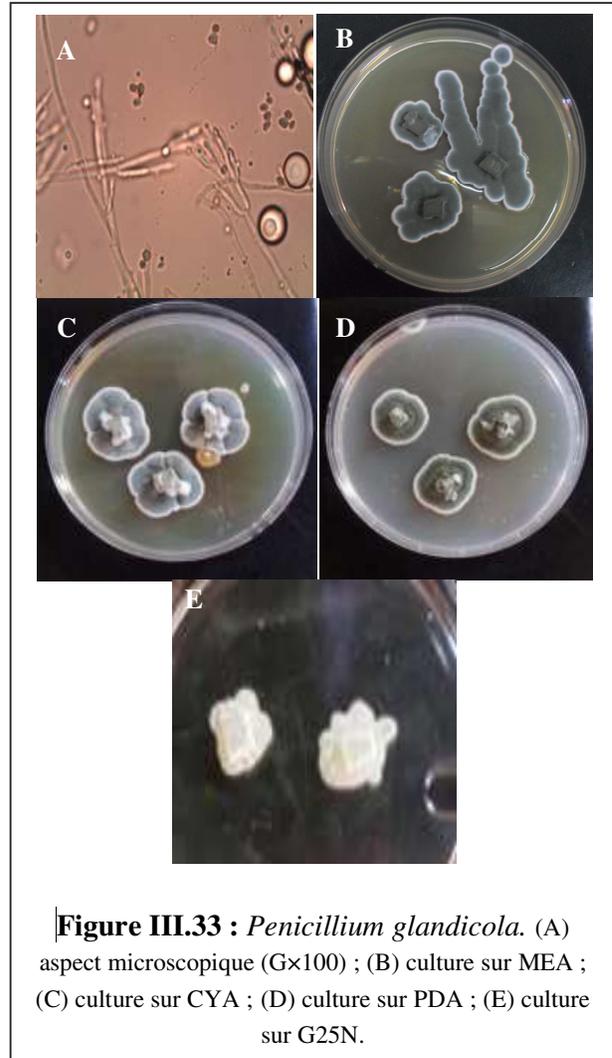


Figure III.33 : *Penicillium glandicola*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA ; (D) culture sur PDA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 34 : *Penicillium italicum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores donnent naissance à des pénicilles triverticillés asymétriques ou irréguliers. Les phialides sont cylindriques. Les conidies sont sphériques disposées en chaîne.

▪ Description macroscopique

Les colonies exposent le même aspect sur les deux milieux CYA et MEA à 25°C. Elles sont denses, veloutées, de couleur bleu grisâtre avec des extrémités blanches et un revers blanc. Leur diamètre se situe entre 40 et 50mm sur CYA et entre 30 et 37mm sur MEA. Notons des traits concentriques profonds. A 5°C, il y a la formation de micro-colonies. A 37°C, les colonies de 60 à 70mm de diamètre, paraissent moins denses, plates et veloutées. Elles présentent un mycélium gris jaunâtre et un revers blanc.

La croissance des colonies de la présente espèce est plus lente sur milieu PDA. Ces dernières ont le même aspect macroscopique que celui présenté sur CYA et MEA. Nous constatons la production d'exsudat jaune vif qui diffuse la gélose.

Sur G25N, les colonies sont de 11mm de diamètre, de couleur marron clair et un revers marron jaunâtre.

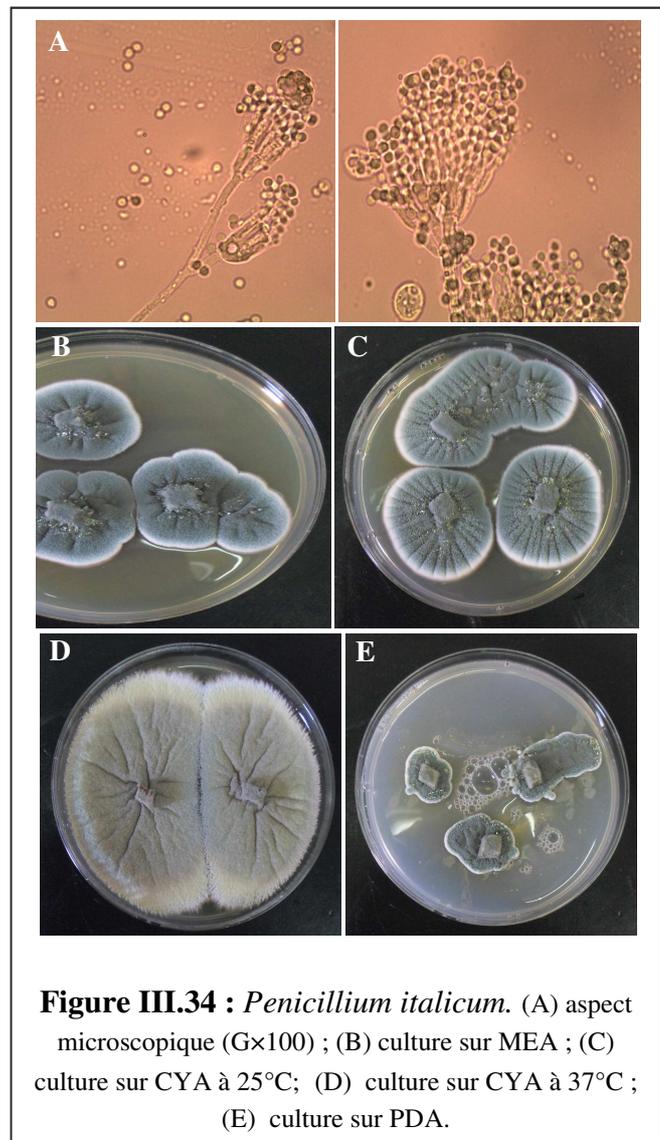


Figure III.34 : *Penicillium italicum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur CYA à 25°C ; (D) culture sur CYA à 37°C ; (E) culture sur PDA.

Fiche 35 : *Penicillium janthinellum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores naissent à partir des hyphes aériens, monoverticillés irrégulier. Les phialides sont ampulliformes donnant naissance à des conidies sphériques.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA ont un diamètre de 31 à 34mm, irrégulièrement froissées, floconneuses et dense, de couleur blanche à 37°C ou marron grisâtre à 25°C ; la production de conidies est très légère à modérée. Un exsudat brun clair à brun rougeâtre est produit par quelques souches. Le revers des colonies est de couleurs variables, brun-jaune ou jaune pâle à brun rougeâtre ou encore pâle. Il y a une germination à 5°C et la formation de micro-conidies de 4 à 5mm de diamètre. A 37°C, les colonies de 10 à 30mm de diamètre sont denses et veloutées.

Les colonies sur MEA atteignent entre 30 à 45mm de diamètre. Elles sont floconneuses, de couleur vert foncé avec un contour blanc et des traits concentriques serrées très visibles. Un pigment soluble jaune orangé diffuse la gélose. Le revers est orange.

Le diamètre des colonies sur G25N varie de 15 à 18mm. Ces dernières sont planes, faibles et floconneuses avec des traits concentriques ; le mycélium est blanc à crème. Sur les trois milieux, les colonies sont bombées au centre.

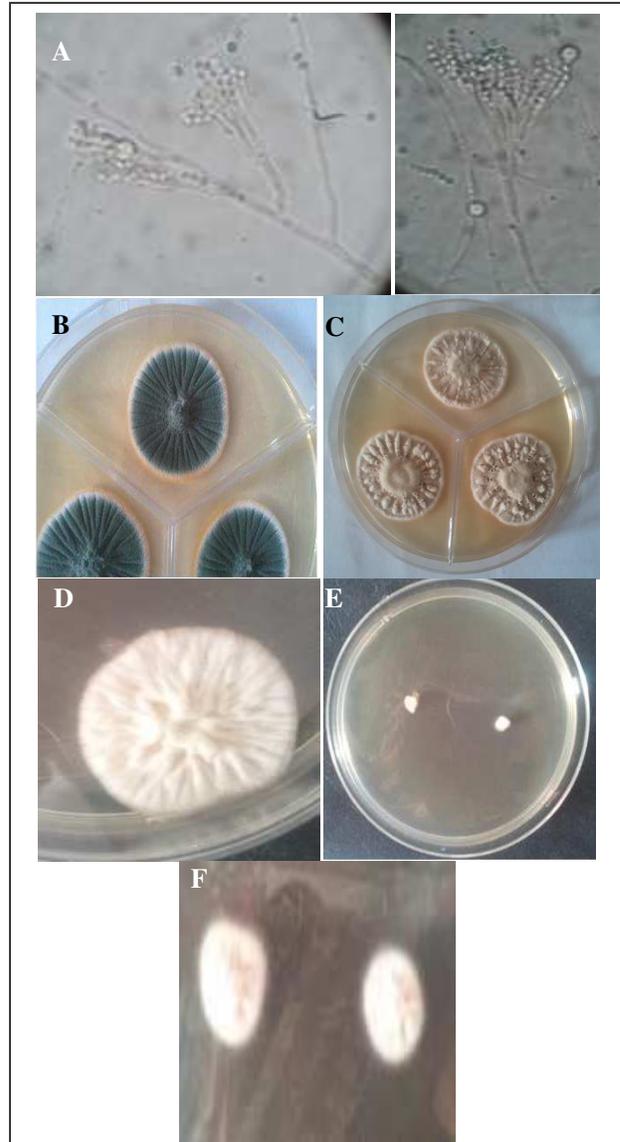


Figure III.35 : *Penicillium janthinellum*. (A) aspect microscopique (Gx100); (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 36 : *Penicillium oxalicum*▪ **Description microscopique**

Les Conidiophores présentent un pinceau biverticillé qui se caractérise par des verticilles portant 2 à 4 métules étroitement plaqués. Les phialides sont acérosées.

▪ **Description macroscopique**

Sur CYA à 25°C, les colonies ont un diamètre allant de 34 à 40mm, elles présentent des lignes concentriques bien visibles, veloutées et de couleur blanche à saumon très pâle qui devient vert bleuâtre après la formation des spores. A 5°C et à 37°C, les spores germent et donnent des colonies blanches de 5 à 9mm de diamètre.

Sur MEA, les colonies atteignent 28 à 33mm de diamètre, de couleur verte bleuâtre avec des lignes concentriques très bien marquées et la production de cristaux transparents. Le thalle de cette espèce est velouté et très dense.

Sur PDA, les colonies ont le même aspect présenté par les colonies sur les milieux MEA et CYA, mais avec des diamètres moins importants (21 à 24mm) et une couleur vert grisâtre. Notons également la production d'exsudats qui diffusent la gélose.

Sur G25N, les colonies de couleur crème, atteignent 21 à 33mm de diamètre.

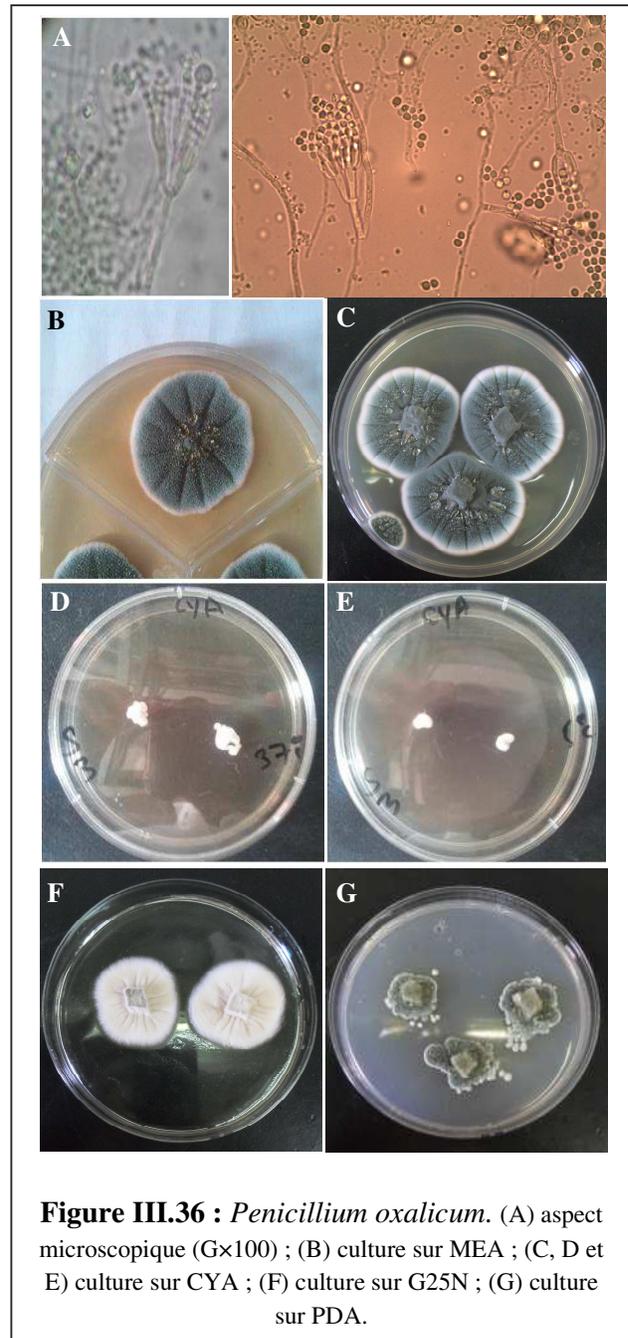


Figure III.36 : *Penicillium oxalicum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N ; (G) culture sur PDA.

Fiche 37 : *Penicillium paxilli*

▪ Description microscopique

Les conidiophores se terminent par cinq métules en moyenne. Les phialides sont ampulliformes donnant naissance à des conidies sphériques.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA atteignent 23 à 27mm de diamètre, elles sont veloutées et légèrement floconneuses. Le mycélium est blanc à la marge et grisâtre au centre. La production de conidies est modérée. A 5°C il y a la formation de micro-colonies de 3 à 4mm ; pendant qu'elles atteignent 12mm à 37°C.

Les colonies sur MEA d'un diamètre moyen de 31mm, présentent un mycélium plane, velouté et floconneux au centre, de couleur blanc à chamois. Les conidies sont de couleur vert grisâtre et le revers est brun pâle.

Les colonies sur G25N ont un diamètre de 33mm avec des traits concentriques ; elles sont denses, floconneuses et de couleur crème foncé.

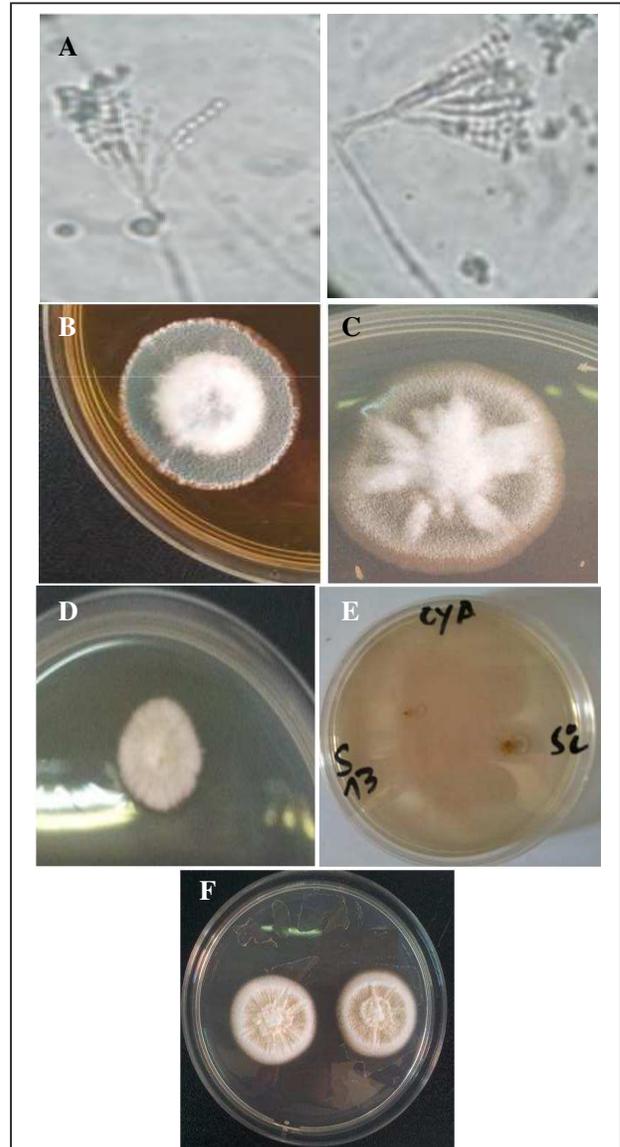


Figure III.37 : *Penicillium paxilli*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N.

Fiche 38 : *Penicillium pinophilum*

▪ Description microscopique

Les penicilli sont biverticillés symétriques portant des conidies subsphéroïdales.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA à 25°C ont un diamètre de 37mm et un centre ridé. Le thalle de couleur jaune-citron vif est floconneux. Le revers est orange pâle. A 5°C, il n'y a pas de germination. A 37°C, les colonies peuvent croître sur toute la surface de la boîte de Pétri, elles sont très ridées. Le mycélium est de couleur marron foncé avec un revers brun clair.

Sur MEA à 25°C, le diamètre moyen des colonies est de 37mm, elles sont planes, veloutées, floconneuses, de couleur jaune devenant jaune verdâtre (pistache). Le revers est jaune pâle.

Sur G25N, nous assistons après 14 jrs d'incubation, à la formation de micro-colonies de 5mm de diamètre.

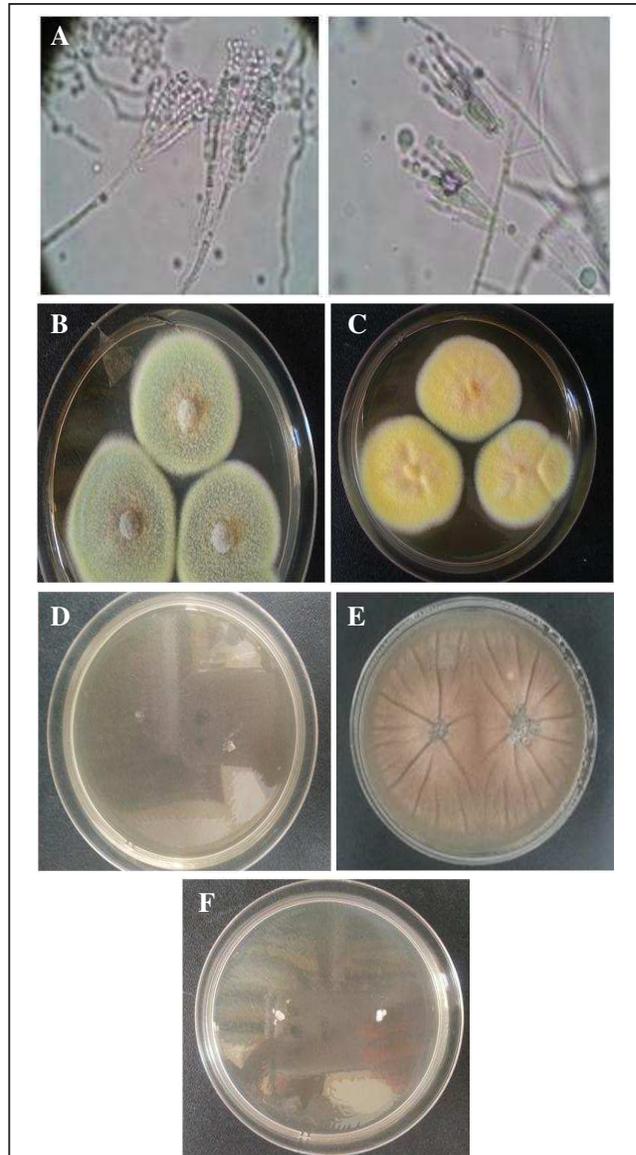


Figure III.38 : *Penicillium pinophilum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N

Fiche 39 : *Penicillium simplicissimum*

▪ Description microscopique

Les conidiophores portent des verticilles irréguliers monoverticillés et/ou biverticillés. Les phialides sont ampulliformes, elles portent des conidies sphériques à subsphériques.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA ont un diamètre qui varie entre 50 et 53mm ; elles présentent des traits concentriques bien distincts. Le mycélium est dense, blanc à chamois devenant kaki avec l'âge. Le revers est pâle. A 5°C après 14jrs de culture, il y a la formation de micro-conidies de 10mm de diamètre. A 37°C, les colonies couvrent la totalité de la boîte de Pétri, présentant le même aspect que celui des colonies sur le même milieu à 25°C mais avec une couleur marron foncé grisâtre et une texture légèrement poudreuse.

Sur MEA, elles atteignent 40mm de diamètre moyen. Elles sont planes, veloutées et floconneuses. Le mycélium blanc devient vert grisâtre à vert bleuâtre après la production de conidies. Le revers est pâle.

Les colonies sur G25N de 16 à 21mm de diamètre, sont planes et blanches avec un revers pâle.

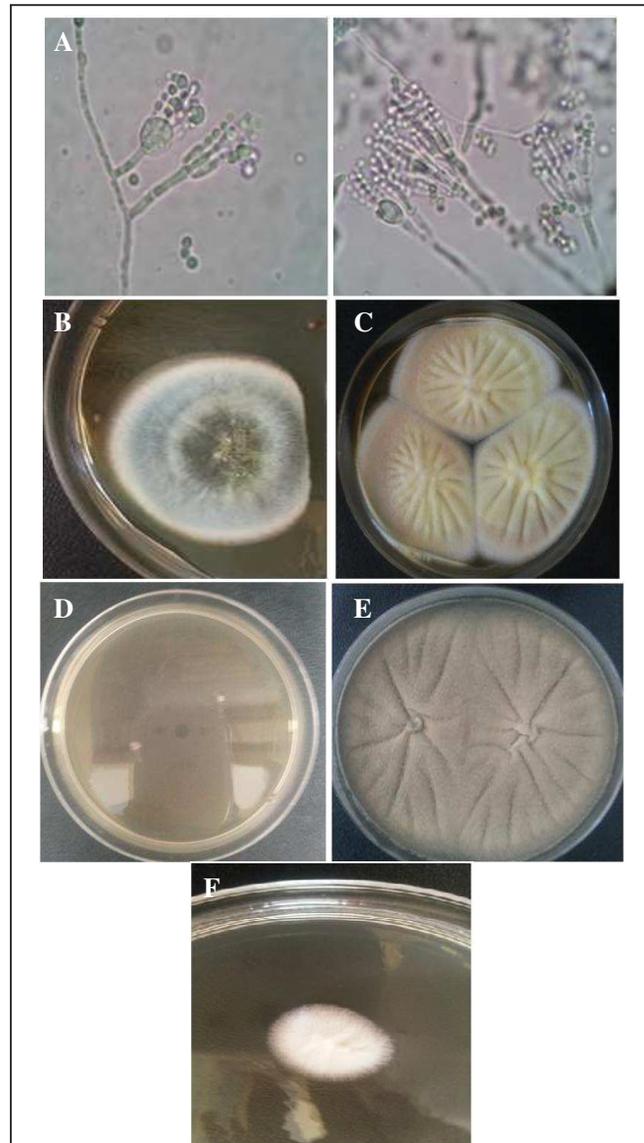


Figure III.39 : *Penicillium simplicissimum*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D et E) culture sur CYA ; (F) culture sur G25N

Fiche 40 : *Penicillium thomii*

▪ Description microscopique

Les conidiophores sont monoverticillés portant de larges phialides. Les conidies ellipsoïdales sont disposées en longues colonnes irrégulières.

▪ Description macroscopique

Les colonies sur CYA de 54mm de diamètre sont légèrement moins floconneuses que celles sur le milieu MEA, mais présentent la même couleur. Le revers est brun-orange. A 5°C nous assistons à la formation des colonies blanches grisâtres pouvant atteindre 50mm de diamètre en moyenne, après 14jrs de culture. Pas de croissance à 37°C.

Les colonies sur G25N atteignent, en moyenne, 21mm de diamètre, elles sont radialement ridées et surélevées au centre. Le mycélium est blanc et le revers est d'une couleur pâle.

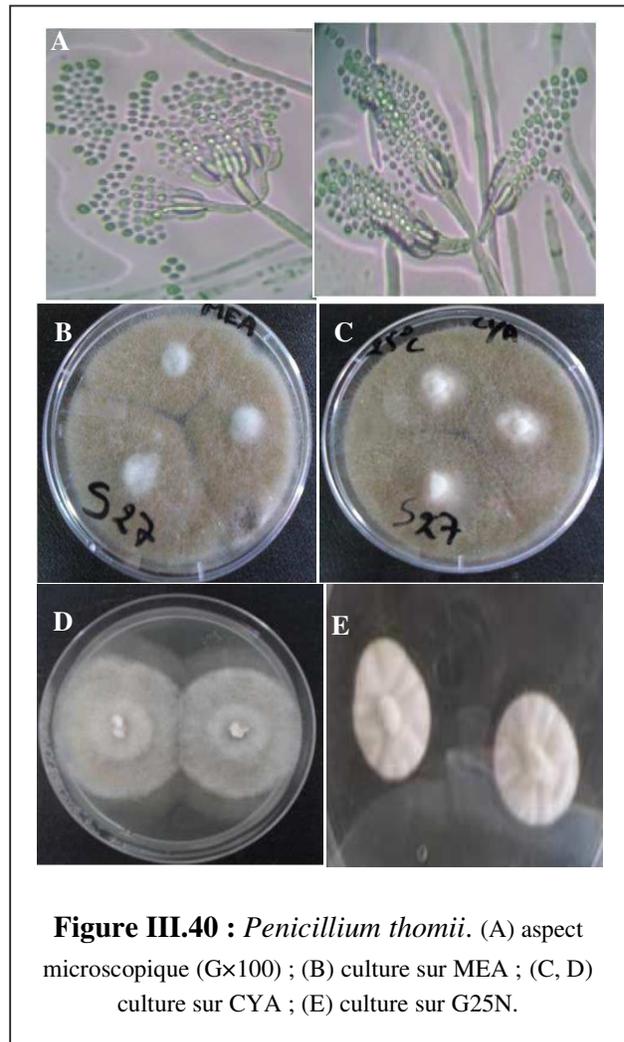


Figure III.40 : *Penicillium thomii*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D) culture sur CYA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 41 : *Penicillium variable*▪ **Description microscopique**

Le conidiophore est biverticillé, terminé par un seul étage de ramifications disposées symétriquement et régulièrement autour de l'axe. Les phialides sont longues et cylindriques.

▪ **Description macroscopique**

Sur CYA à 25°C, les colonies ont le même aspect que celui des colonies sur MEA, avec un diamètre légèrement supérieur (24mm en moyenne) et des conidies moins abondantes. A 5°C, les colonies germent tardivement pour atteindre 11mm de diamètre après 14jrs d'incubation. Pas de croissance à 37°C.

Sur MEA, les colonies ont un diamètre de 22mm. Elles sont planes, de couleur jaune sulfureux et d'abondantes conidies vertes grisâtres sont produites ; le centre des colonies est clair.

Sur G25N, les colonies atteignent 25mm de diamètre. Elles présentent une couleur crème.

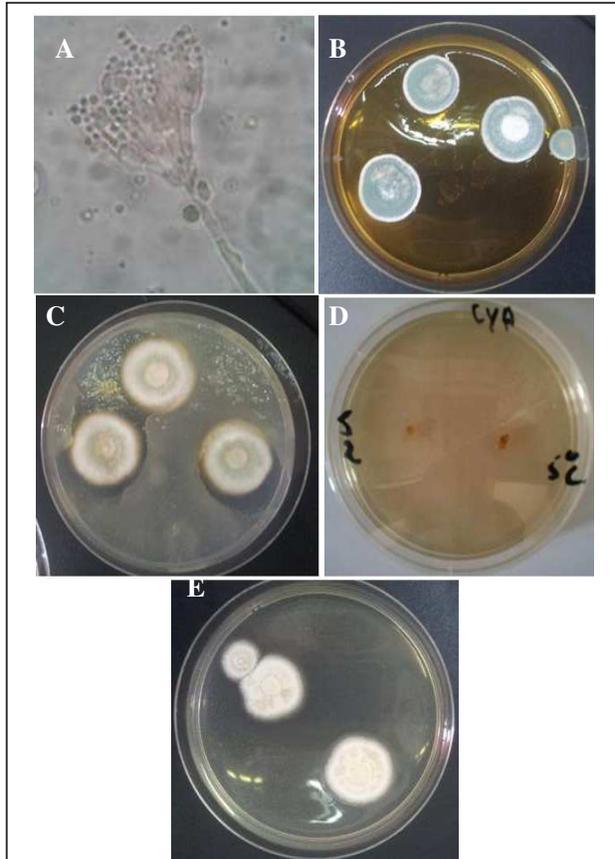


Figure III.41 : *Penicillium variable*. (A) aspect microscopique (G×100) ; (B) culture sur MEA ; (C, D) culture sur CYA ; (E) culture sur G25N.

Fiche 42 : *Ulocladium botrytis*

▪ Description microscopique

Les conidies du genre *Ulocladium* ressemble fortement à celles des *Alternaria*. Elles naissent en groupe de quatre à cinq conidies à partir de courts hyphes. Leur taille est variable et leur couleur est marron chocolat voire noire. Elles se présentent avec des cloisons horizontales (3 cloisons en moyenne), de formes ellipsoïdales plus étroites à la base.

▪ Description macroscopique

Les colonies présentent le même aspect sur les trois milieux classiques d'identification, notamment MEA, CYA et PDA. Elles paraissent grises noirâtre voire noires avec un revers de la même couleur, denses, planes et floconneuses. Sur les deux premiers milieux, leur diamètre dépasse 60mm, pendant que sur PDA il oscille entre 32 et 36mm. A 5°C, nous enregistrons la formation de micro-colonies après 15jrs d'incubation. A 37°C, nous assistons à la croissance de colonies de 17mm de diamètre moyen.

Sur DCMA, les colonies sont moins denses, floconneuses et de couleur gris noirâtre. Elles atteignent 49 à 57mm de diamètre.

Sur G25N des colonies grises de 22 à 30mm de diamètre se forment avec un revers de la même couleur.

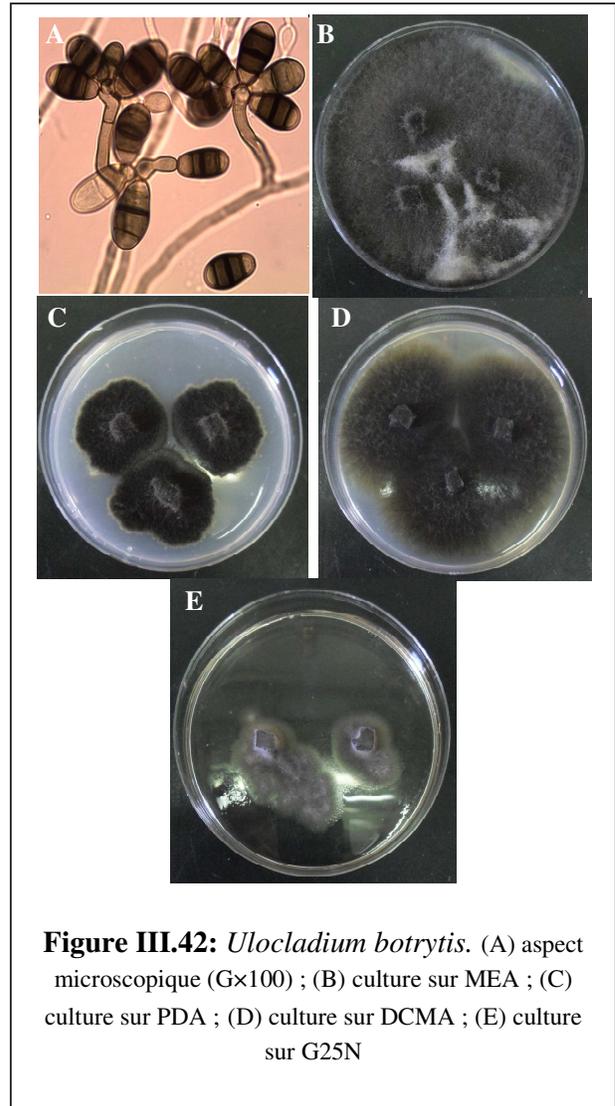


Figure III.42: *Ulocladium botrytis*. (A) aspect microscopique (Gx100) ; (B) culture sur MEA ; (C) culture sur PDA ; (D) culture sur DCMA ; (E) culture sur G25N

III.1.2.3 Caractérisation physiologique de *F. graminearum*

Les essais de l'effet des températures, des pH, des A_w et des différentes concentrations en NaCl ont été effectués sur six souches de *F. graminearum* choisies aléatoirement. Notons que la caractérisation physiologique n'a été réalisée que sur *F. graminearum*, objet de notre travail de thèse.

III.1.2.3.1 Effets des différentes températures

Les résultats illustrés par la **figure III.43** montrent que l'intervalle des températures permettant une croissance optimale des différentes souches de *F. graminearum* se situe entre 20 et 25°C avec un minimum de croissance qui oscille entre un diamètre moyen de 17 et 31mm respectivement après 48h d'incubation et un maximum de croissance de 90mm après 5 voire 7jrs d'incubation. Par ailleurs, la croissance maximale est révélée à 30°C avec un minimum moyen de 17mm après 48h d'incubation et un maximum de 90mm après 6 à 12jrs d'incubation. A 10°C et à 15°C, leur croissance devient importante au 6^{ème} jr d'incubation pour atteindre son maximum de croissance au 10^{ème} ou au 12^{ème} jr d'incubation. La température minimale de la croissance des six souches est de 5°C. Nous notons que *F. graminearum* ne croit pas à 35°C, à 40°C, ni à 45°C.

III.1.2.3.2 Effets des différents pH

Les résultats obtenus montrent que la croissance optimale des six souches étudiées de *F. graminearum* est à pH neutre (pH 7) voire légèrement acide (pH 5 à 6) ; tandis que le pH minimal est de 2. Aux pH alcalins (8, 9, 10 et 11), le diamètre mycélien moyen est au maximum de 80mm pour pH 8 et pH 9 et 70mm pour pH 10 et pH 11. A pH 4, la croissance mycélienne est modérée (**Figure III.44**).

III.1.2.3.3 Effets des différentes A_w

Les résultats démontrés par la **figure III.45**, dévoilent que l'intervalle de l' A_w permettant une croissance optimale de *F. graminearum* se situe entre 0,995 et 0,98 avec, en moyenne, un minimum de croissance de 20mm après 48h d'incubation et un maximum de croissance de 88mm après 7jrs d'incubation. Par ailleurs, nous constatons que sa croissance diminue avec la diminution de l' A_w .

III.1.2.3.4 Effets de différentes concentrations en NaCl

Les résultats obtenus révèlent que l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu influe négativement la croissance de *F. graminearum* bien qu'elle n'empêche pas totalement son développement mais, le NaCl exerce un retard de sa croissance de quelques jours. En effet, la croissance optimale de cette espèce est enregistrée à 1% de NaCl après 7jrs et diminue au fur et à mesure que nous augmentons la concentration de NaCl dans le milieu (**Figure III.46**).

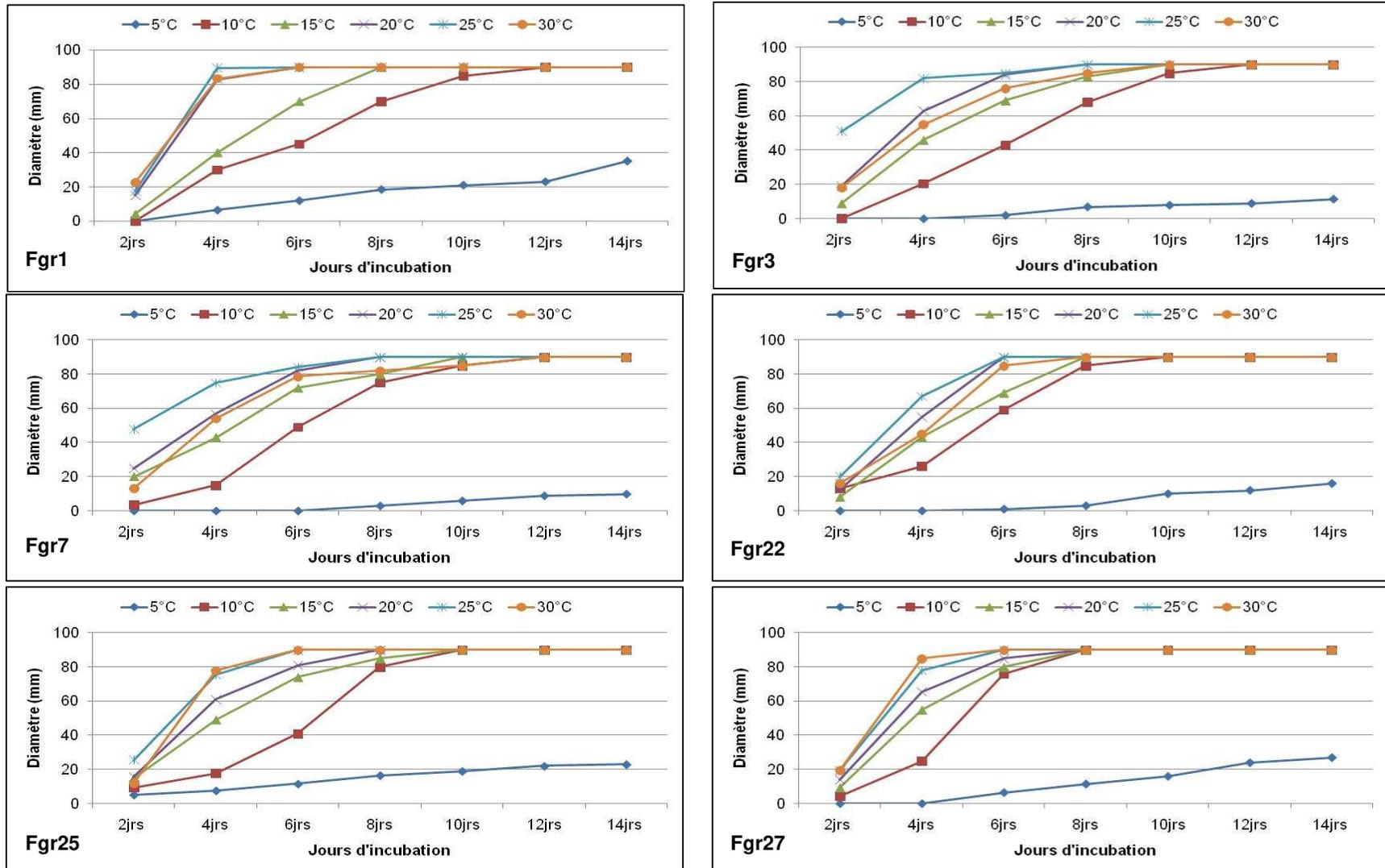


Figure III.43 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de *F. graminearum* à différentes températures.

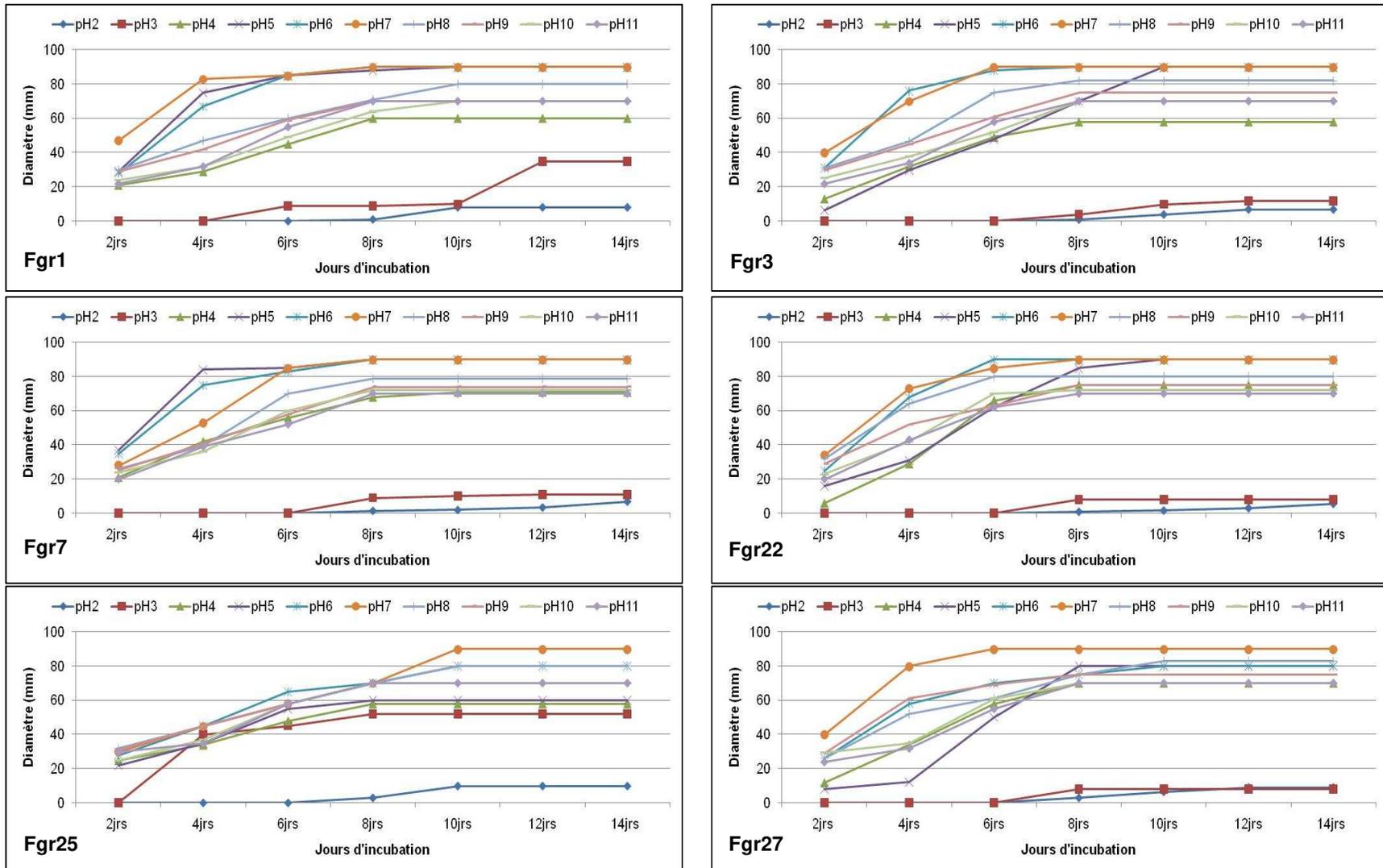


Figure III.44 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de *F. graminearum* à différents pH.

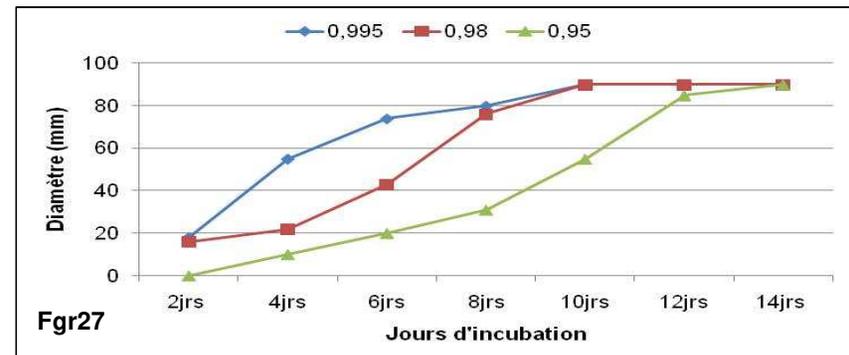
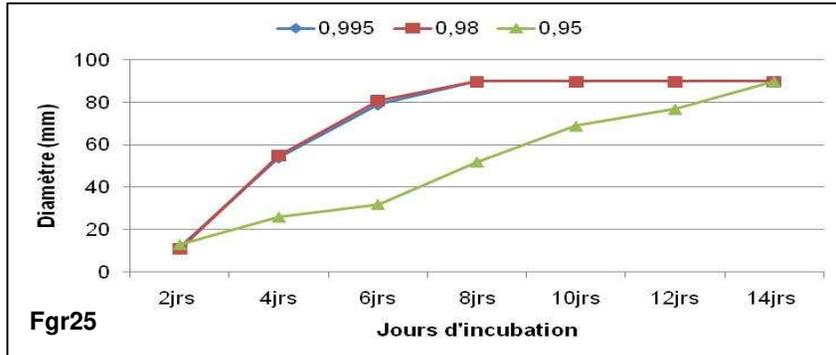
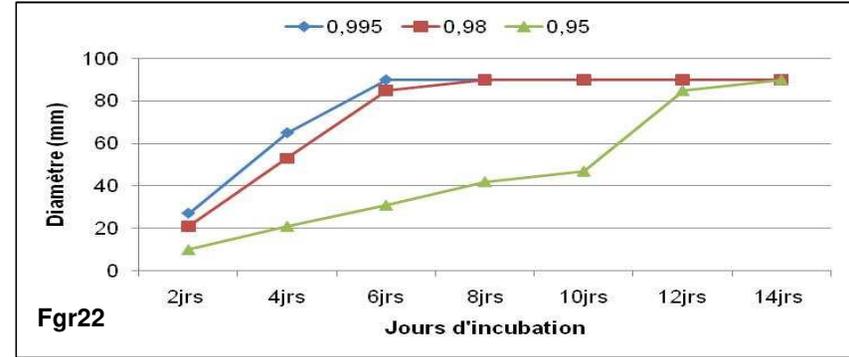
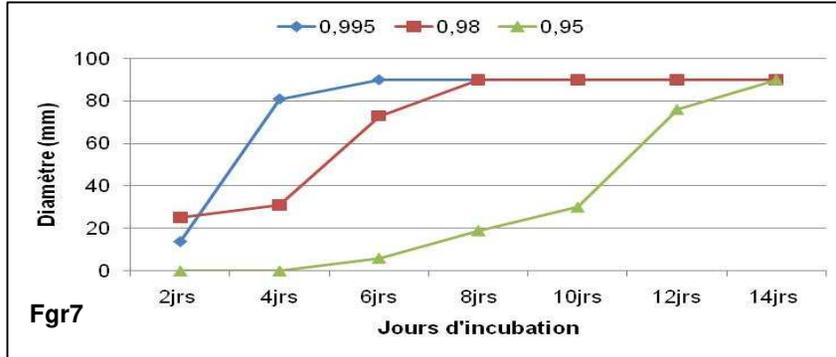
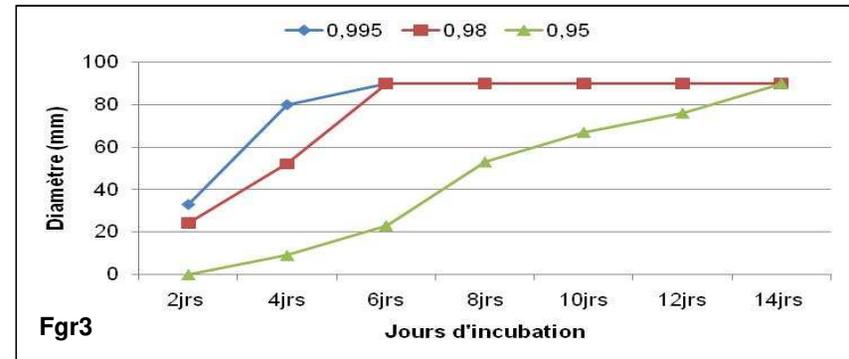
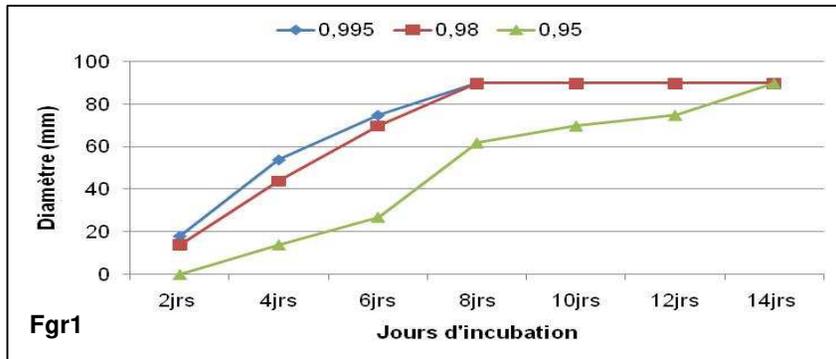


Figure III.45 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de *F. graminearum* à différentes Aw.

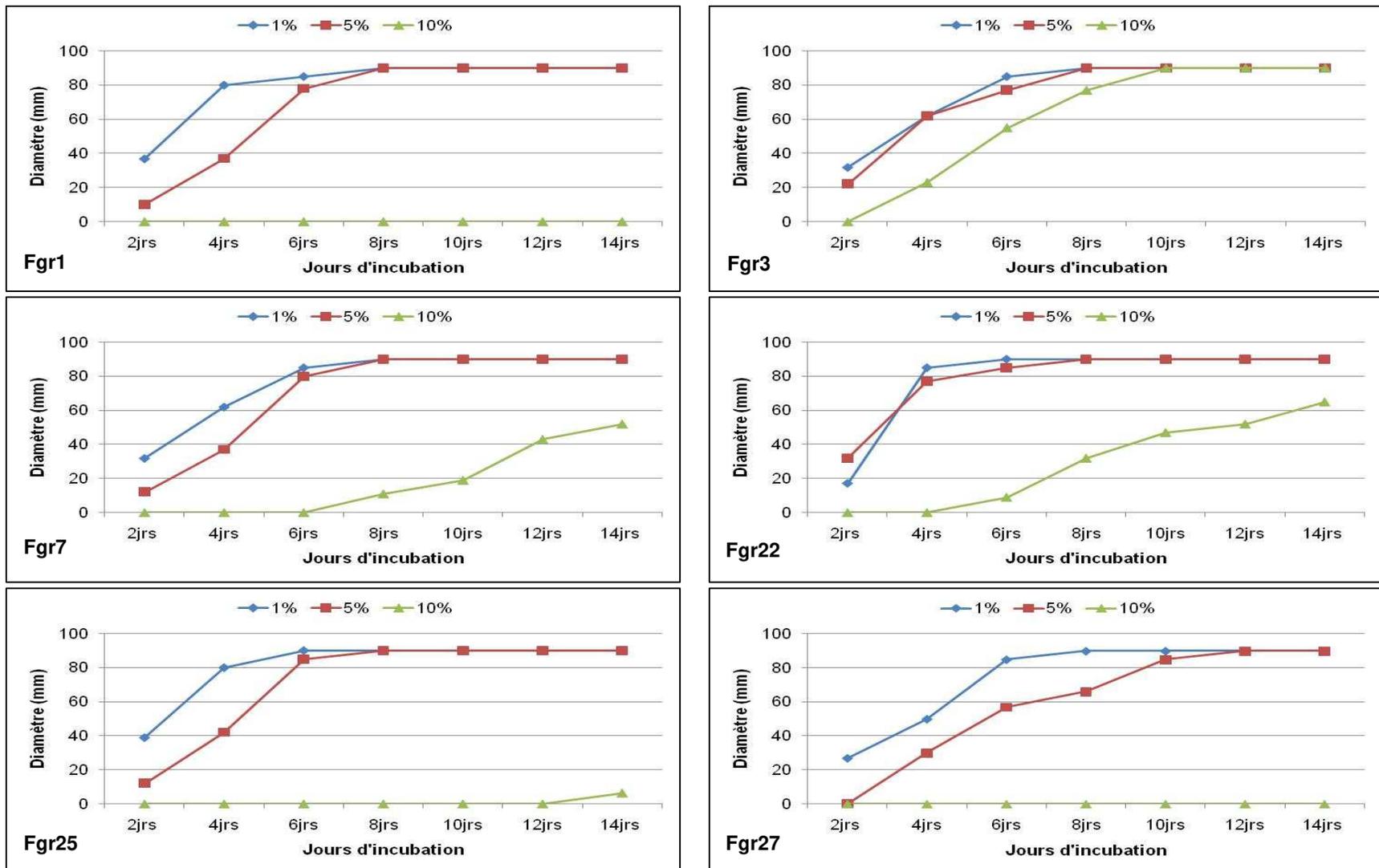


Figure III.46 : Cinétique de la croissance mycélienne des isolats de *F. graminearum* à différentes concentrations en NaCl.

III.1.3 Caractérisation mycotoxicologique

III.1.3.1 Recherche des souches de *F. graminearum* productrices de déoxynivalénol (DON)

D'après la plaque CCM (Figure III.47), nous constatons que les souches Fgr27, Fgr25, Fgr22 et Fgr1 sont productrices du déoxynivalénol ; pendant que les souches Fgr3, Fgr2 et Fgr7 ne le sont pas. Notons que la limite de détection de cette méthode est de 25 à 50 µg DON/g pour les extraits purifiés (Balzer, 2003 ; Tabuc, 2007).



Figure III.47 : Plaque CCM des isolats de *F. graminearum* à Chemotype DON.

III.1.3.2 Recherche de la toxine déoxynivalénol (DON) au niveau du substrat

- Dosage du DON par CCM

La plaque CCM ci-après révèle l'absence de la toxine déoxynivalénol sur les 35 substrats dosés. Ceci signifie-t-il que les grains de blé tendre et dur sont salubres ?



Figure III.48 : Plaque CCM pour le dosage du DON à partir du substrat.

▪ Dosage du DON par ELISA quantitative

Le dosage du DON à partir du substrat par ELISA quantitative nous a permis de détecter la concentration en DON dans chaque échantillon de blé (**Figure III.49**). Les résultats obtenus révèlent que la quantité minimale en DON est inférieure à 0,04ppm dans les échantillons E4, E5, E7, E9, E10, E11 et E12 du blé tendre importé et dans l'échantillon E2 du blé tendre local ; pendant que la quantité maximale en DON est supérieure à 5ppm enregistrée pour les échantillons E1, E2, E6 et E8 du blé tendre importé (**Tableau III.9**).

Tableau III.9 : Quantité en déoxynivalénol dans le blé tendre local et importé.

Code	Echt	Quantité en DON (0,04-5 ppm* pour blé tendre)
BTL	E1	0,949
	E2	< 0,04
BTF	E1	>5
	E2	>5
	E3	0,970
	E4	< 0,04
	E5	< 0,04
	E6	>5
	E7	< 0,04
	E8	>5
	E9	< 0,04
	E10	< 0,04
	E11	< 0,04
	E12	< 0,04

*1ppm DON= 1µg DON/g de blé=1000µg/Kg.

Pour ce qui est des échantillons du blé dur, les quantités en DON oscillent entre un minimum inférieur à 0,12ppm retrouvé dans les échantillons E1, E6, E10 et E11 du blé dur local et dans les échantillons E3, E4 et E5 du blé dur importé, et un maximum supérieur à 15ppm dans les échantillons E1, E6, E7 et E8 du blé dur local et dans l'échantillon E2, E3 et E9 du blé dur importé.

Il est à noter que le seuil en déoxynivalénol (DON) exigé par la réglementation 856/2005 JOCE du 6 juin 2005 dans les céréales brutes destinées à la consommation humaine est de 1250µg/Kg ; et il est de 1750µg/Kg pour le blé dur (**Boutigny, 2007**). En comparaison avec les quantités obtenues, nous constatons que les deux échantillons du blé tendre local répondent à la norme ; pendant que les échantillons E1, E2, E6 et E8 du blé tendre importé de France dépassent largement la limite qui est de 1250µg/Kg. Pour le blé dur local, nous réalisons que les échantillons E3, E4 et E5 dépassent le seuil exigé de 8 fois ; pendant que les échantillons restants sont dans la norme. De même pour le blé dur importé, les échantillons E2, E3, E4, E5 et E9 dépassent le seuil exigé de trois voire huit fois.

Tableau III.10 : Quantité en déoxynivalénol dans le blé dur local et importé.

Code	Echt	Quantité en DON (0,12-15 ppm* pour blé dur)**
BDL	E1	< 0,12
	E2	1,320
	E3	>15
	E4	>15
	E5	>15
	E6	< 0,12
	E7	1,528
	E8	0,548
	E9	0,835
	E10	< 0,12
	E11	< 0,12
	E12	0,178
BDF	E1	< 0,12
	E2	>15
	E3	>15
	E4	3,657
	E5	8,817
	E6	< 0,12
	E7	< 0,12
	E8	< 0,12
	E9	>15

*1 ppm DON= 1µg DON/g de blé=1000µg/Kg.

**Selon les instructions du fabricant, les valeurs du DON obtenues du dosage des échantillons du blé dur, doivent être multipliées par le coefficient 3.

**Figure III.49** : Résultats du test ELISA (Celer DON V₃ de marque tecnalab).

III.2 Seconde partie : Biocontrôle de *Fusarium graminearum*

III.2.1 Résultats des interactions entre les espèces fongiques

III.2.1.1 Confrontation par contact direct

- Entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp*

Les résultats illustrés sur la **figure III.50_A** révèlent un important effet inhibiteur des trois souches d'*A. parasiticus vis-à-vis* de *F. graminearum*. En effet, la présence d'*A. parasiticus* a diminué la croissance de l'agent pathogène de 80mm de diamètre (témoin) à un diamètre moyen de 32mm soit un taux d'inhibition moyen de 60%.

Par ailleurs, en présence des trois souches d'*A. flavus*, la diminution de la croissance mycélienne de *F. graminearum* en comparaison à celle du témoin s'avère plus significative. Le pourcentage d'inhibition oscille entre un minimum de 67,5% [Fgr Vs Afl₂] et un maximum de 72,5% [Fgr Vs Afl₃] (**Figure III.50_B**).

Les valeurs moyennes du diamètre des colonies de *F. graminearum* en présence d'*A. niger* sont inférieures à celles de la colonie témoin à raison d'un taux moyen de 57,50% (**Figure III.50_C**). Nous notons la synthèse d'exsudats jaunes par *F. graminearum* en présence des agents antagonistes et un virement de la couleur de sa colonie vers le jaune vif (en comparaison avec le témoin) (**Figure III.51**).

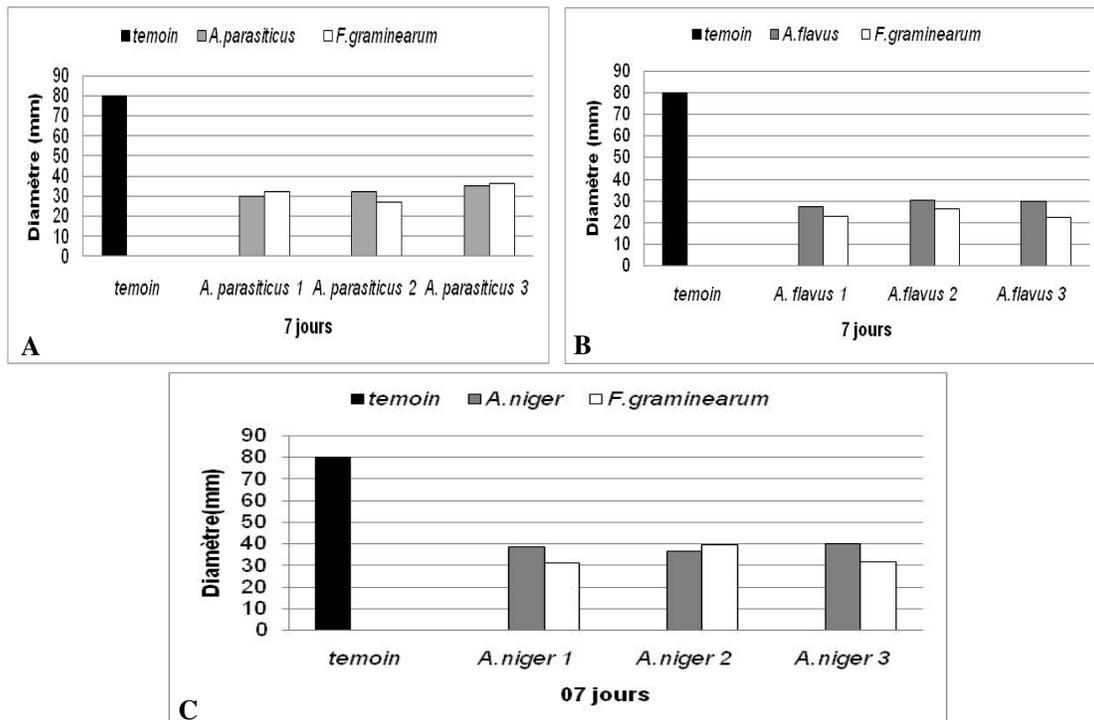


Figure III.50 : Confrontation directe entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp*. (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang.

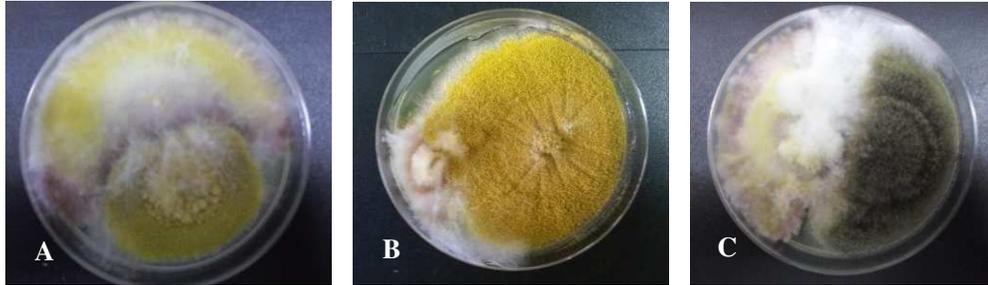


Figure III.51 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct entre *Aspergillus sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang

- **Entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp***

Les résultats obtenus montrent que la vitesse de croissance du pathogène est très importante par rapport à celle des agents antagonistes. De ce fait, nous constatons un effet inhibiteur modéré, il oscille entre 16,25% et 33,75%, pour l'interaction Ccl Vs Fgr ; pendant qu'il se situe entre 15% et 37,5% pour l'interaction Cchb Vs Fgr (**Figure III.52 et Figure III.53**).

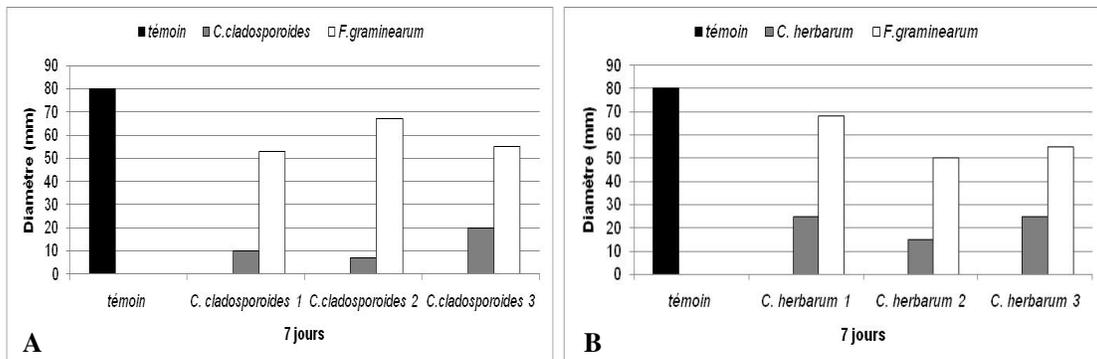


Figure III.52 : Confrontation directe entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp.* (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

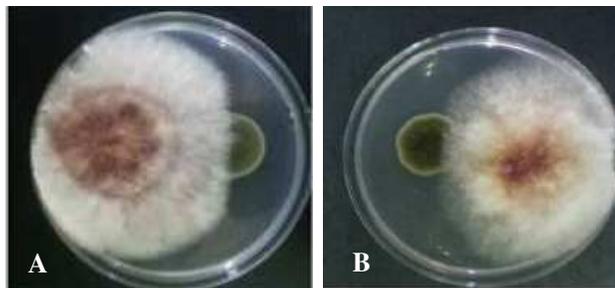


Figure III.53 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct entre *Cladosporium sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

- **Entre *F. graminearum* et *P. janthinellum***

Les résultats illustrés par l'histogramme en **Figure III.54** révèlent un effet inhibiteur faible voire moyen des trois souches de *P. janthinellum* sur *F. graminearum*. Nous notons 22,02% pour l'interaction Fgr Vs Pjt₃, 49,40% pour l'interaction Fgr Vs Pjt₁ et 50,60% pour l'interaction Fgr Vs Pjt₂. Nous constatons, également, l'apparition de pigment jaune brun secrété par les souches 2 et 3 de *P. janthinellum* sur le milieu (**Figure III.55**).

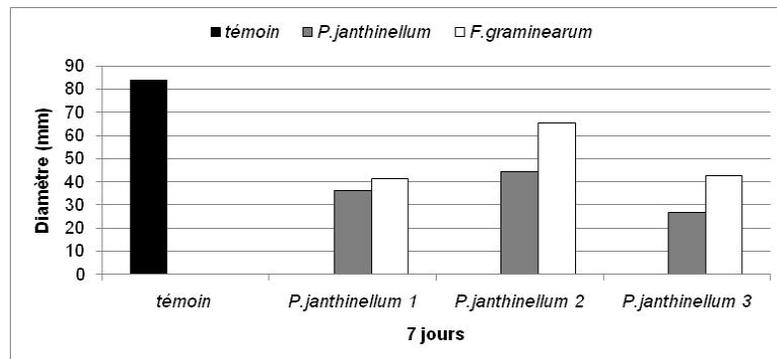


Figure III.54 : Confrontation directe entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*.



Figure III.55 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct entre *P. janthinellum*. et *F. graminearum*.

III.2.1.2 Confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène)

- **Entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp***

Les résultats mentionnés sur la **figure III.56** révèlent que les souches d'*A. niger* sont les plus performantes et ont exercé un effet anti-*F. graminearum* qui oscille entre 81,88% (Ang 1) et 97,5% (Ang 2 et 3).

Par contre, en présence d'*A. parasiticus*, nous constatons une diminution significative du diamètre des colonies de *F. graminearum* particulièrement, en présence de la souche 1 (80%). Il est à noter que la souche 2 a présenté un taux d'inhibition de 48,75%, mais qui s'est diminué en permettant l'envahissement presque total du pathogène.

De même, les souches d'*A. flavus* ont montré un important taux d'inhibition qui se situe entre 69,38% et 76,25%. Cependant, ce taux a diminué après 10jrs d'incubation et a permis l'envahissement du pathogène (**Figure III.57**).

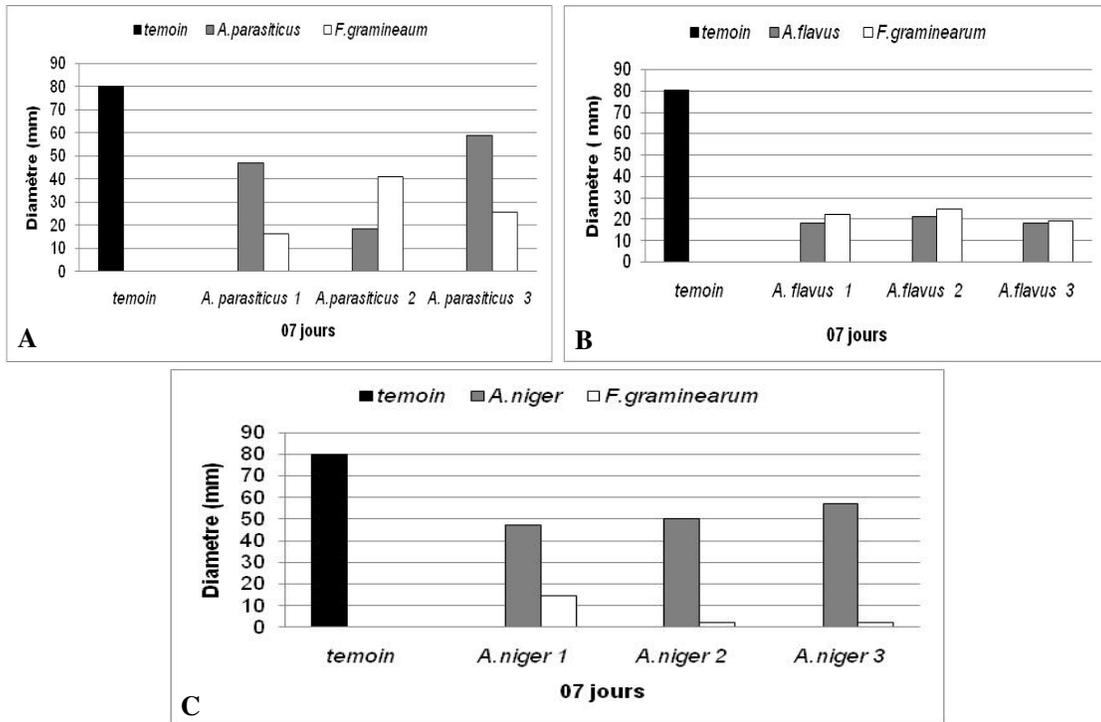


Figure III.56 : Confrontation directe à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp.* (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang.

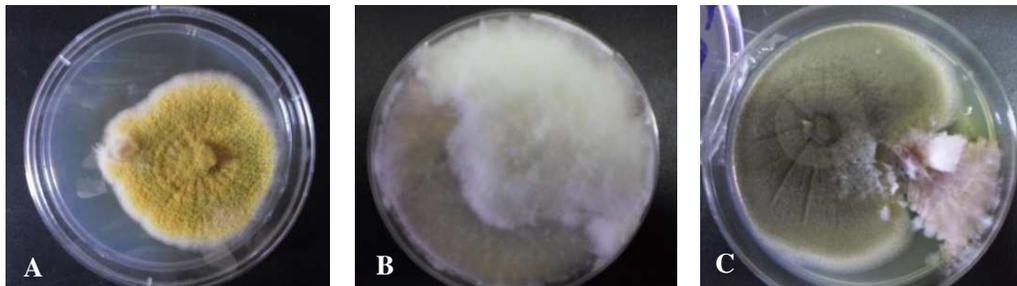


Figure III.57 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h- Agent pathogène) entre *Aspergillus sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang

▪ Entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp*

Les résultats obtenus montrent un modeste, voire moyen effet inhibiteur des souches des deux espèces de *Cladosporium* sur la croissance de *F. graminearum*. Ce dernier a envahi l'ensemble de la boîte de Pétri et a synthétisé un exsudat jaune avec le virement de la couleur de la colonie vers le jaune poussin. Nous marquons un pourcentage d'inhibition

allant de 6,25% à 37,5% exercé par la deuxième et la première souche de *C. herbarum*, respectivement, et entre 33,75% et 52,5% exercé par la troisième et la deuxième souche de *C. cladosporoides*, respectivement (**Figure III.58** ; **Figure III.59**).

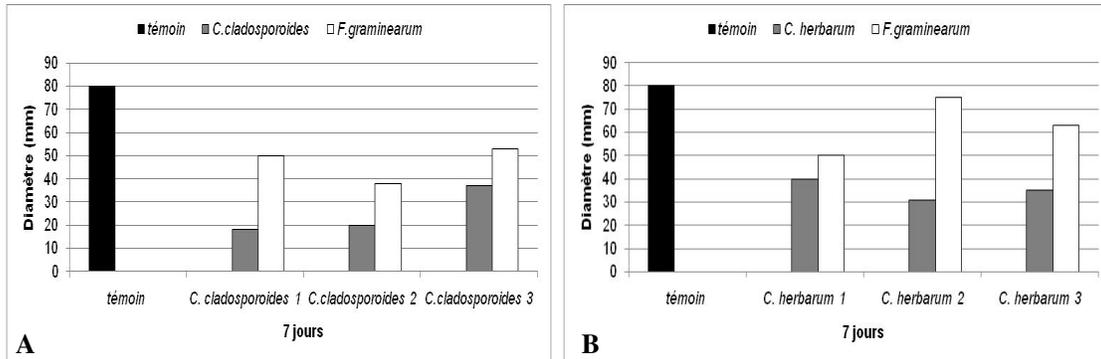


Figure III.58 : Confrontation directe à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp.* (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

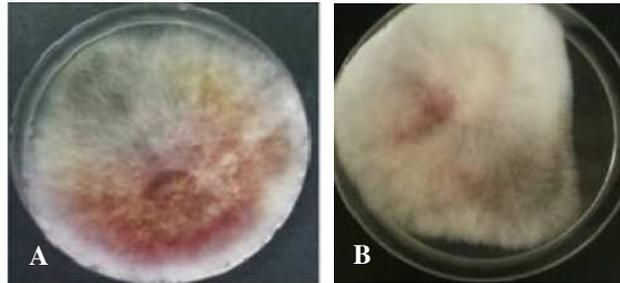


Figure III.59 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre *Cladosporium sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

- **Entre *F. graminearum* et *P. janthinellum***

L'exploitation des résultats obtenus, révèlent un taux d'inhibition qui varie entre un minimum de 53,57% (souche 2) et un maximum de 83,93% exercé par la souche 1 (**Figure III.60** ; **Figure III.61**).

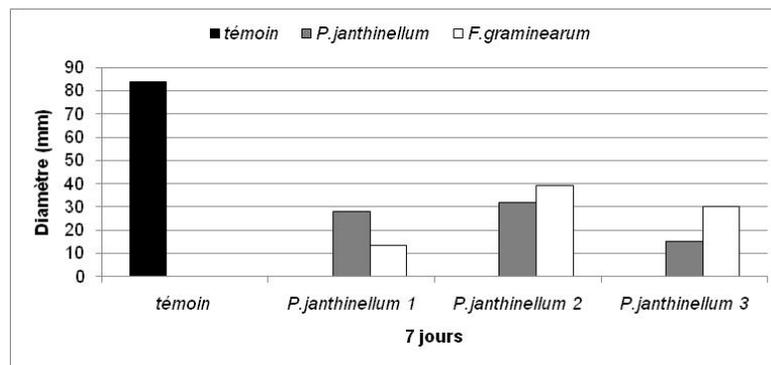


Figure III.60 : Confrontation directe à distance de temps (Agent antagoniste-72h- Agent pathogène) entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*.



Figure III.61 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent antagoniste-72h-Agent pathogène) entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*.

III.2.1.3 Confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste)

- **Entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp***

Les souches des trois espèces aspergillières ont montré un effet antagoniste considérable vis-à-vis de *F. graminearum*. Nous enregistrons un taux minimal de 28,13%, 40,63% et 65,63%, pendant que le taux maximal est de 48,75% 51,79% et 78,75% exercé par *A. parasiticus*, *A. flavus* et *A. niger*, respectivement (**Figures III.62 ; Figure III.63**).

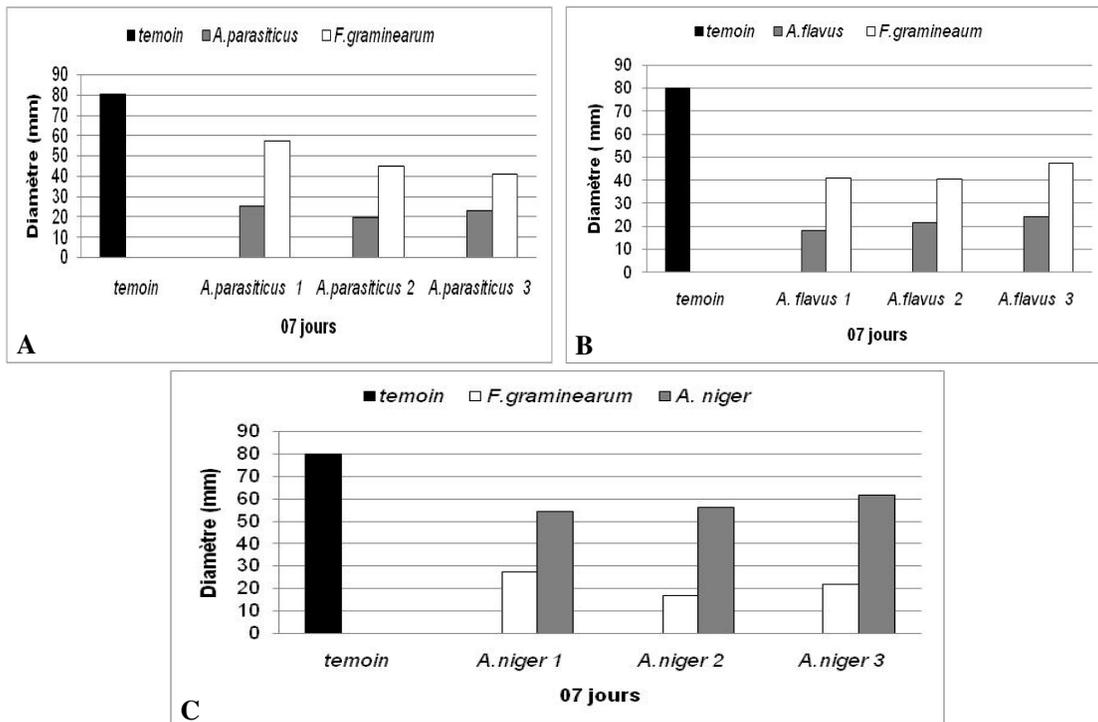


Figure III.62 : Confrontation directe à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp*. (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang.



Figure III.63 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène -72h-Agent antagoniste) entre *Aspergillus sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang

▪ **Entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp.***

Pour ce cas d'étude, les résultats montrent une très légère répression de la croissance de l'agent pathogène par les souches de *C. cladosporoides* et *C. herbarum*. Elle est de l'ordre de 2,5% (Ccl 1), 8,75% (Chb 2), 12,5% (Ccl 2, Chb 1 et 3) et 13,75% (Ccl 3). Notons également, l'envahissement du milieu par *F. graminearum* et la synthèse d'exsudat jaune qui diffuse sur la gélose (**Figure III.64 ; Figure III.65**).

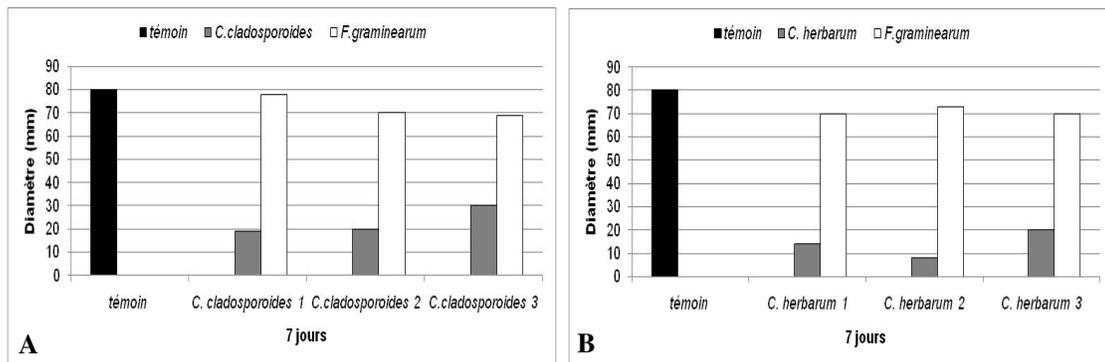


Figure III.64 : Confrontation directe à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp.* (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

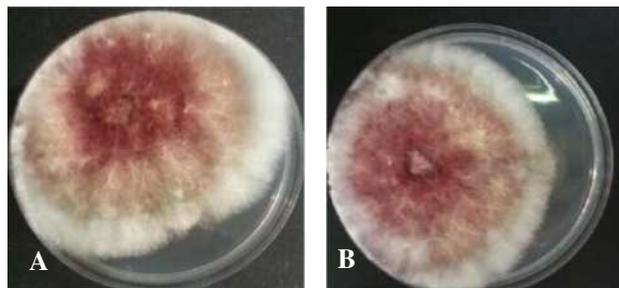


Figure III.65 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène -72h-Agent antagoniste) entre *Cladosporium sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

- **Entre *F. graminearum* et *P. janthinellum***

De même, les résultats obtenus divulguent un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 13,10% par la souche 1, 13,69% par la souche 2 et 27,98% par la souche 3, ceci quand le pathogène est introduit 72h avant les souches antagonistes. De plus, nous constatons l'envahissement du pathogène au-delà de l'antagoniste (**Figure III.668 ; Figure III.67**).

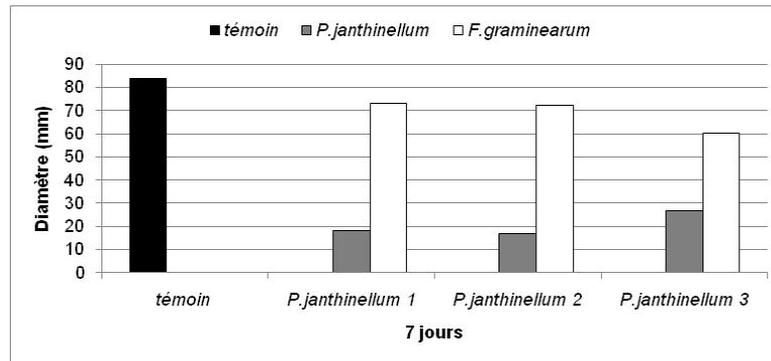


Figure III.66 : Confrontation directe à distance de temps (Agent pathogène-72h-Agent antagoniste) entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*.



Figure III.67 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct à distance de temps (Agent pathogène -72h-Agent antagoniste) entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*

III.2.1.4 Confrontation par contact direct à distance d'espace

- **Entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp***

Les résultats illustrés par les **figures III.68 et III.69**, exposent un effet inhibiteur très élevé exercé par les souches d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* vis-à-vis de *F. graminearum*. Il est de l'ordre de 83,93% à 98,81% pour les souches d'*A. flavus* et de 98,81% pour les souches d'*A. parasiticus*. Pendant que les souches d'*A. niger* ont présenté un effet antagoniste de 66,67% exercé par la souche 1, 83,93% par la souche 2 et 64,29% réalisé par la souche 3.

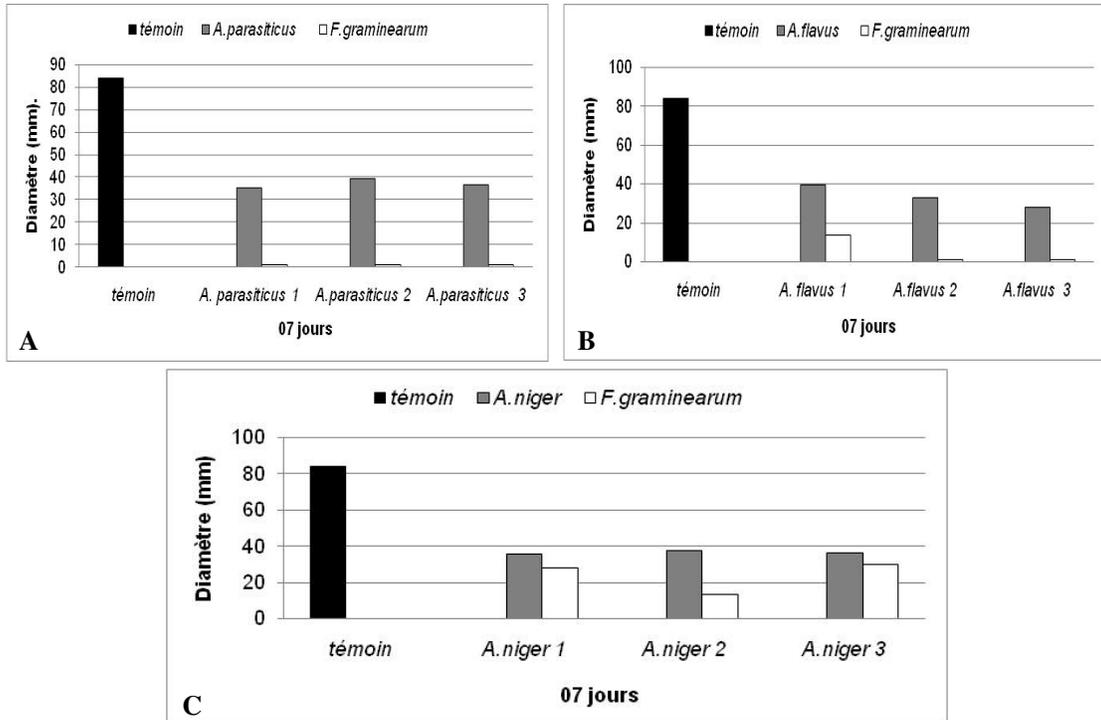


Figure III.68 : Confrontation directe à distance d'espace entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp.* (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang.

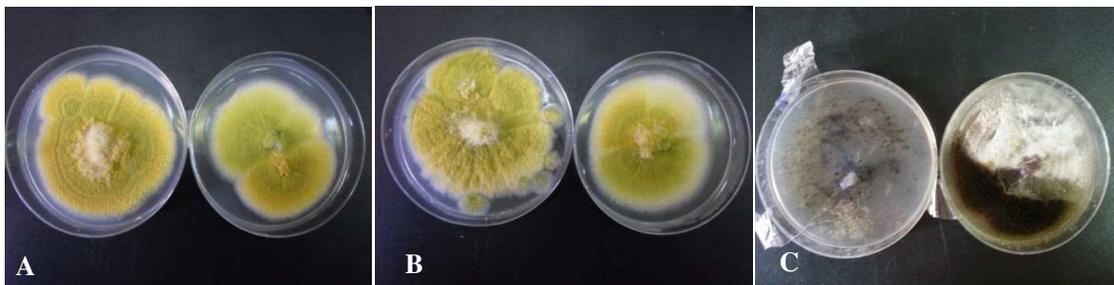


Figure III.69 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance d'espace entre *Aspergillus sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Apr ; (B) Fgr Vs Afl ; (C) Fgr Vs Ang

- **Entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp***

Les résultats illustrés par la **figure III.70** révèlent l'absence totale d'effet inhibiteur et la dominance des espèces fusariennes, à l'exception de la troisième souche de *C. herbarum* qui a prouvé un effet répresser de 46,43%. En comparaison avec le témoin, nous notons un changement de la couleur de la colonie de *F. graminearum* du rose grenat vers l'orange jaunâtre (**Figure III.71**).

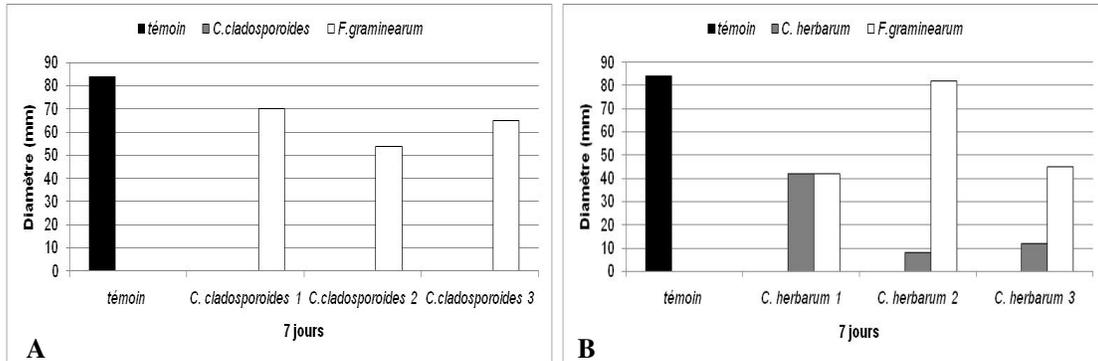


Figure III.70 : Confrontation directe à distance d’espace entre *F. graminearum* et *Cladosporium sp.* (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

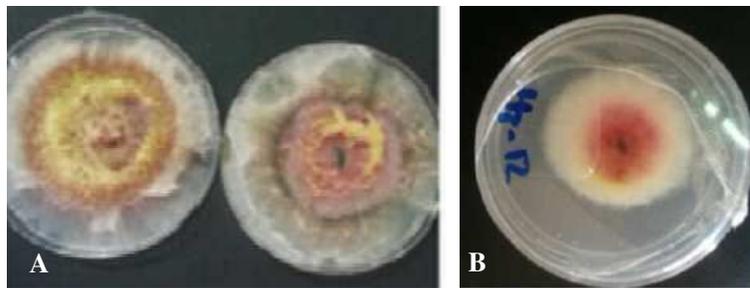


Figure III.71 : Photos illustratives de la confrontation par contact direct à distance d’espace entre *Cladosporium sp.* et *F. graminearum*. (A) Fgr Vs Ccl ; (B) Fgr Vs Chb.

▪ **Entre *F. graminearum* et *P. janthinellum***

Les résultats obtenus révèlent l’envahissement du milieu par *F. graminearum* (Figures III.72 ; Figure III.73).

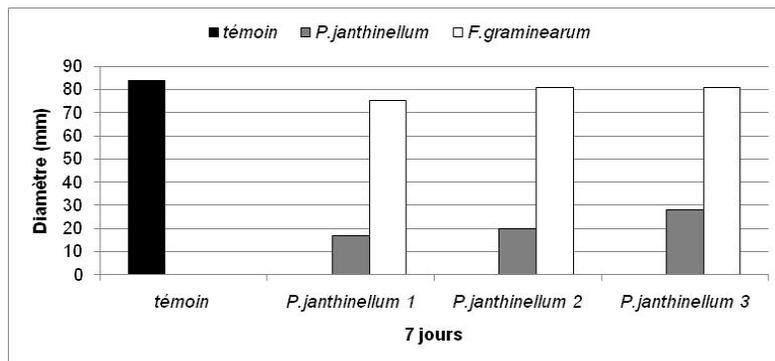


Figure III.72 : Confrontation directe à distance d’espace entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*.

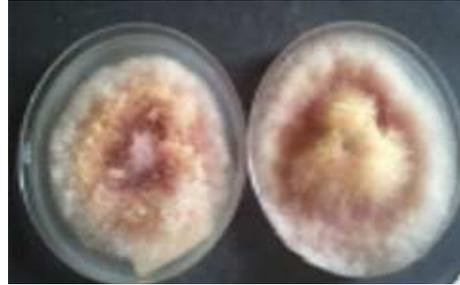


Figure III.73 : Photo illustrative de la confrontation par contact direct à distance d'espace entre *F. graminearum* et *P. janthinellum*

Le tableau ci-après donne les taux d'inhibition de la croissance de *F. graminearum* par chaque souche des différentes espèces fongiques antagonistes par technique d'antagonisme.

Tableau III.11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. graminearum*

Agents antagoniste	Souche	% d'inhibition de la croissance de <i>Fusarium graminearum</i>			
		Technique 1	Technique 2	Technique 3	Technique 4
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Apr 1	59,38	80	28,13	98,81
	Apr 2	66,25	48,75	43,75	98,81
	Apr 3	54,38	68,13	48,75	98,81
<i>Aspergillus flavus</i>	Afl 1	71,88	72,5	48,75	83,93
	Afl 2	67,5	69,38	51,79	98,81
	Afl 3	72,5	76,25	40,63	98,81
<i>Aspergillus niger</i>	Ang 1	61,25	81,88	65,63	66,67
	Ang 2	50,63	97,5	78,75	83,93
	Ang 3	60,63	97,5	72,5	64,29
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	Ccl 1	33,75	37,5	2,5	16,67
	Ccl 2	16,25	52,5	12,5	35,71
	Ccl 3	31,25	33,75	13,75	22,62
<i>Cladosporium herbarum</i>	Chb 1	15	37,5	12,5	50
	Chb 2	37,5	6,25	8,75	2,38
	Chb 3	31,25	21,25	12,5	46,43
<i>Penicillium janthinellum</i>	Pjt 1	50,60	83,93	13,10	15
	Pjt 2	22,02	53,57	13,69	00
	Pjt 3	49,40	64,29	27,98	15,63

Il est à noter que les boîtes témoins de *F. graminearum*, relatives à chaque technique sont en annexe III.

III.2.2 Activité antifongique des bactéries lactiques

III.2.2.1 Isolement et caractérisation morphologique

La purification et la caractérisation morphologique de 10% du nombre total des bactéries isolées de chaque dilution des différents échantillons des blés, nous a permis de sélectionner 119 isolats bactériens dont 62 sont Gram positif et catalase négative et donc confirmés comme étant probablement, des bactéries lactiques.

L'observation macroscopique des isolats sur MRS agar dévoile la présence de colonies rondes de taille variable d'environ 2 à 5mm de diamètre, lisses de couleur blanchâtre crémeuse, de forme circulaire avec un contour régulier ayant l'aspect d'un grain de lentille.

Sur milieu M17 et Slanetz, les colonies de petite taille sont de couleur crème. Pendant qu'aucune croissance bactérienne n'a été observée sur les milieux BHI et CATC gélosé.

Sur le plan microscopique, l'état frais et la coloration de Gram ont montré que la quasi-totalité des isolats sont sous forme sphérique ou Cocci, (exception faite pour les isolats LAB056, LAB057, LAB058, LAB070, LAB071 et LAB072 qui sont des bacilles), et sont immobiles. Ces bactéries sont Gram positif arrangées en paires (diplocoque), en courte chaînette ou en amas. Notons que le screening préliminaire de leur effet anti-*F. graminearum* nous a permis de ne retenir que 19 isolats (**Tableau III.10**). De ce fait, ces derniers ont été retenus pour les autres analyses de cette partie de thèse.

III.2.2.2 Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique des 19 isolats lactiques montre qu'ils sont capables de croître à un large intervalle de température avec une température optimale qui se situe entre 30°C et 37°C et maximale de 45°C. Notons que six souches sur dix-neuf sont incapables de croître à 10°C. Par ailleurs, l'ensemble des bactéries étudiées ne croît pas à 55°C, pendant qu'elles résistent à 60°C durant 30mn. De plus, ces isolats ont la capacité de croître à 4,5% voire 6,5% de NaCl, (comme concentration maximale), et à un pH qui oscille entre 4,4 et 6,5 bien que les isolats LAB002, LAB004, LAB008, LAB011, LAB012, LAB013, LAB015 et LAB018 sont capables de croître, également, à un pH 9,6 (**Tableau III.13**).

III.2.2.3 Caractérisation biochimique

Les dix-neuf isolats sont catalase négative, homo-fermentaires, capables d'hydrolyser l'esculine et l'arginine et dégradent le citrate sur milieu KMK (**Kempler et Mc Kay, 1980**) via l'enzyme catalase. Ils sont immobiles et incapables de dégrader le mannitol (à l'exception de la souche LAB014) ni à produire du dextrane. Par ailleurs, après 48h d'incubation à 37°C, quelques souches ont été capables de réduire le bleu de méthylène à 0,1% et 0,3%, d'autres ont réduit 50% de la quantité du bleu de méthylène à 0,3% ; pendant qu'aucune croissance n'a été observée chez LAB001, LAB008, LAB009, LAB012,

LAB013, LAB014, LAB016 et LAB018 aux deux concentrations du bleu de méthylène. Les dix-neuf isolats lactiques peuvent fermenter divers sources de carbone notamment, sucrose, lactose, xylose, mannose, glycérol, arabinose, glucose, galactose, maltose, sorbitol, raffinose, rhamnose, cellebiose et l'amidon. De plus, la plupart des isolats résistent à une concentration de 0.4% de tellurite. Le **tableau III.13** donne les résultats des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques par isolat.

L'exploitation des résultats des tests biochimiques, via la base de données <https://lab.upbm.org/identifieur/galerie.php> nous a permis l'identification donnée dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.12 : Résultats de l'API 50 CHL

Isolat lactique	Espèce	% de typicité
LAB001	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	NM*
LAB002	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	81.4
LAB003	<i>Pediococcus ssp</i>	94.8
LAB004	<i>Weissella confusa</i>	61.9
LAB005	<i>Pediococcus damnosus 1</i>	100
LAB006	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	11.1
LAB007	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	NM
LAB008	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	33.9
LAB009	<i>Pediococcus ssp</i>	62.7
LAB010	<i>Pediococcus pentasaceus 2</i>	100
LAB011	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	76.8
LAB012	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	99.5
LAB013	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	99.5
LAB014	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	NM
LAB015	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	97.4
LAB016	<i>Lactococcus lactis ssp lactis2</i>	99.5
LAB017	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	NM
LAB018	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	NM
LAB019	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	79.1

*NM : non mentionné

Tableau III.13 : Résultats morphologiques, physiologiques et biochimiques des dix-neuf isolats lactiques.

Caractères	Profil des Bactéries lactiques																		
	Isolats lactiques																		
	LAB1	LAB2	LAB3	LAB4	LAB5	LAB6	LAB7	LAB8	LAB9	LAB10	LAB11	LAB12	LAB13	LAB14	LAB15	LAB16	LAB17	LAB18	LAB19
Morphologiques :																			
Forme cellulaire	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Association cellulaire	Paire	Paire	Amas	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette	Paire	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette	Paire	Amas	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette
Croissance sur :																			
MRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M17	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Slanetz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Physiologiques :																			
Température :																			
10°C	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Concentration en NaCl :																			
4.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH :																			
4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.6	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Biochimiques :																			
Type de fermentation	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF	HomF
Bleu de méthylène :																			
0.1%	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
0.3%	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Hydrolyse :																			
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dégradation du citrate :																			
KMK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmons	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dégradation du mannitol/ Mobilité :																			
Production de :																			

Dextrane Acétoïne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Profil des isolats lactiques par les galeries API50 CHL																				
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARA	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
RIB	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
SOR	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
MDM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
ARB	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CEL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
MEL	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
SAC	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
RAF	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
AMD	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
TUR	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TAG	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : positive ; (-) : négative ; (Homf) : homofermentaire.

III.2.2.4 Caractérisation d'intérêt sanitaire

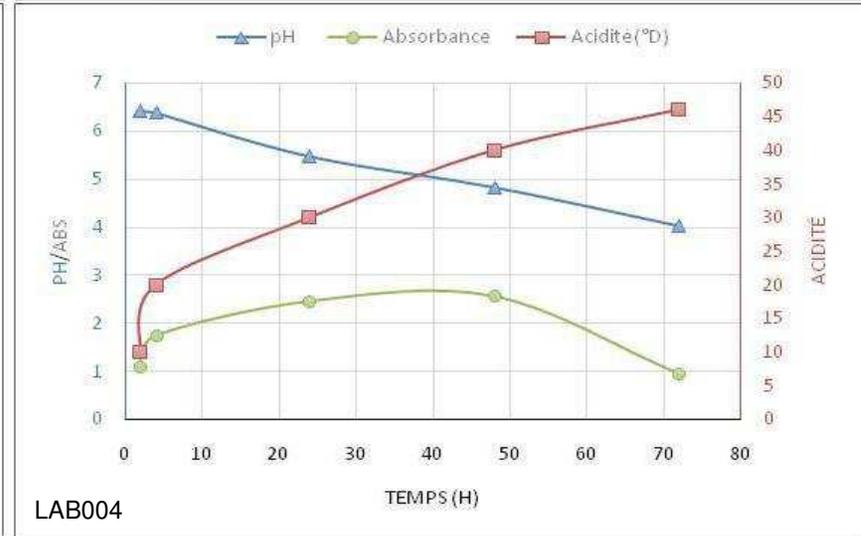
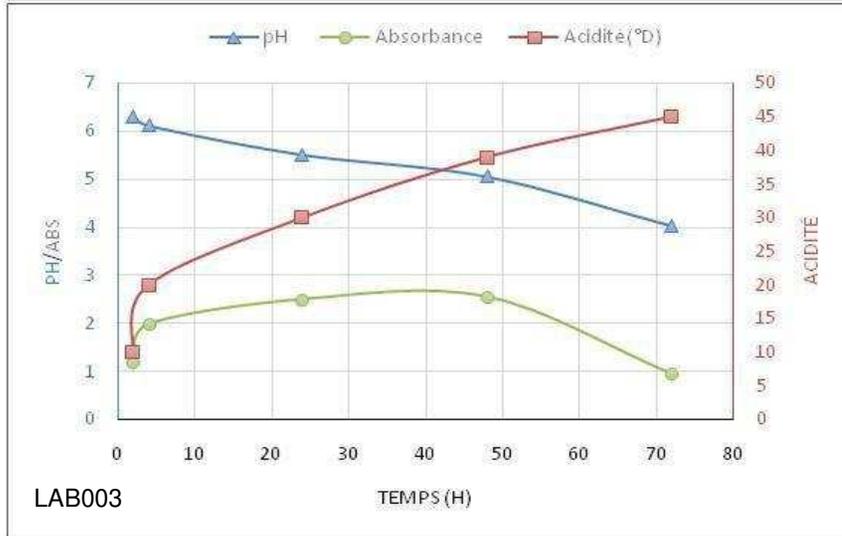
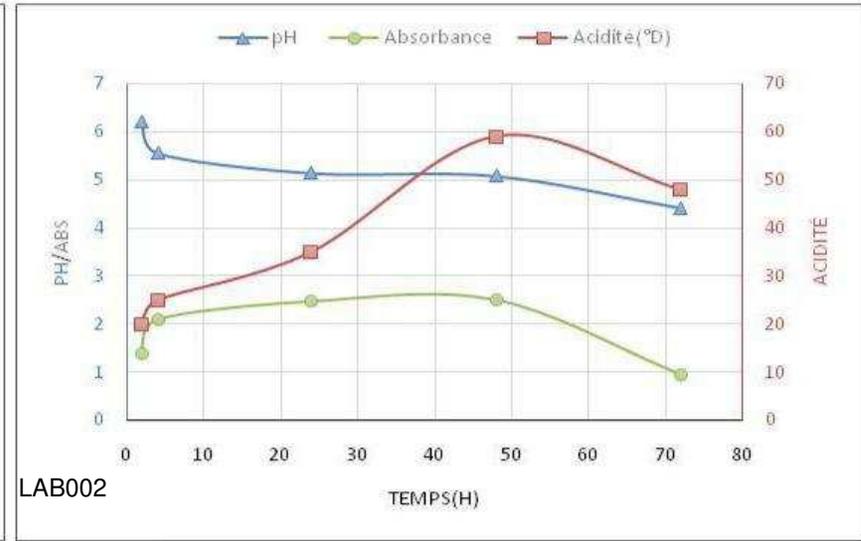
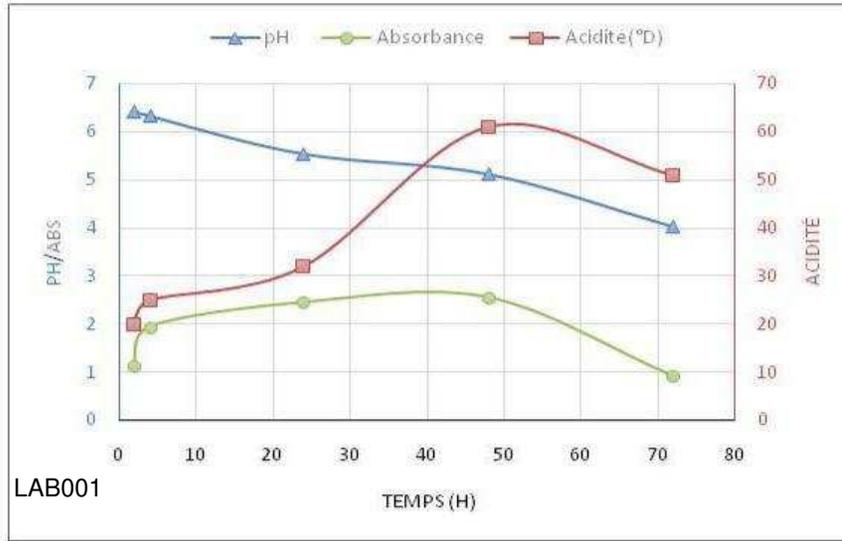
La caractérisation sanitaire avait pour but de distinguer les isolats virulents des non virulents. Cette étape a été réalisée par deux tests qui sont la recherche de la gélatinase et du type hémolytique. Les résultats obtenus révèlent que l'ensemble des isolats sont γ -hémolytiques et gélatinase négative.

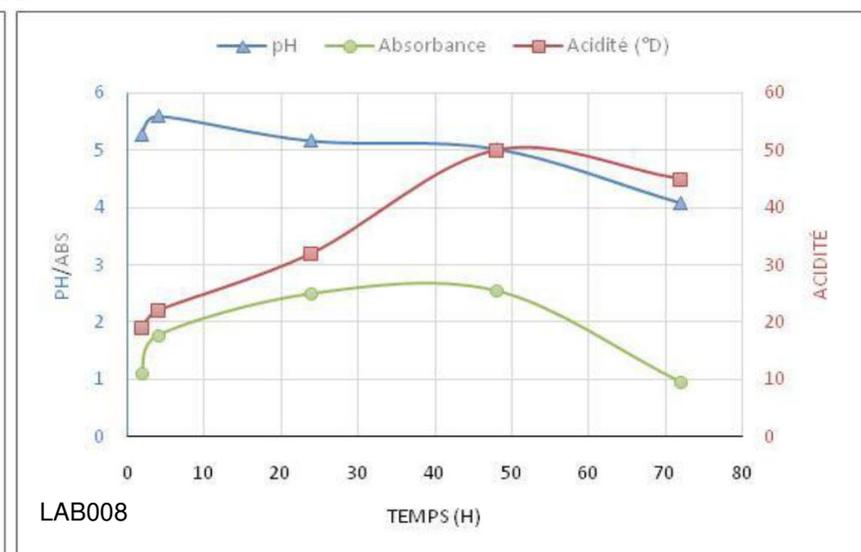
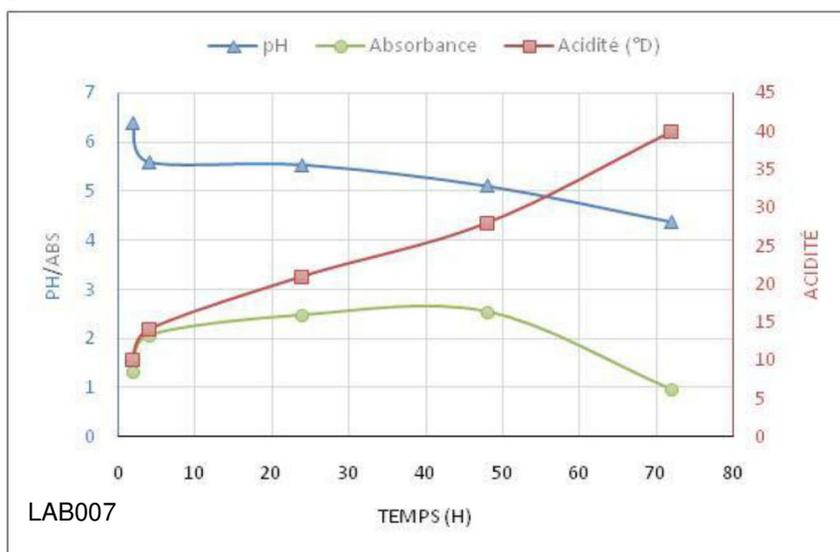
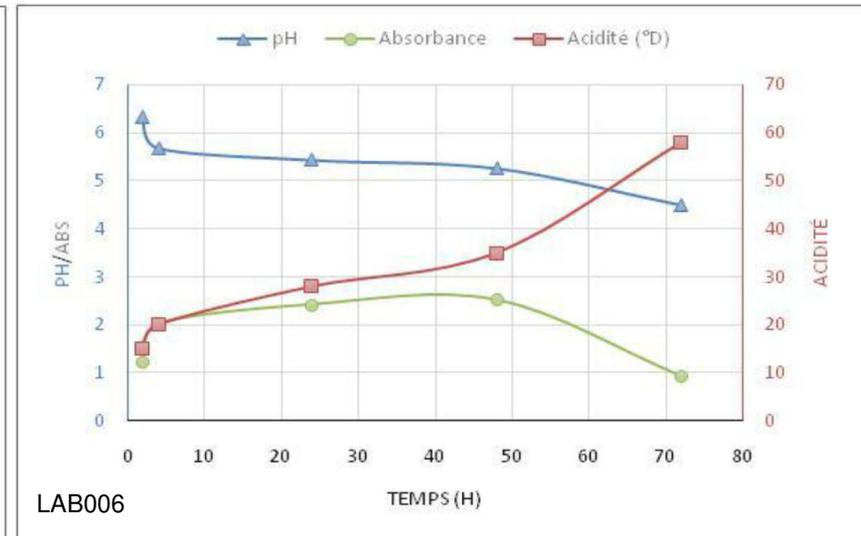
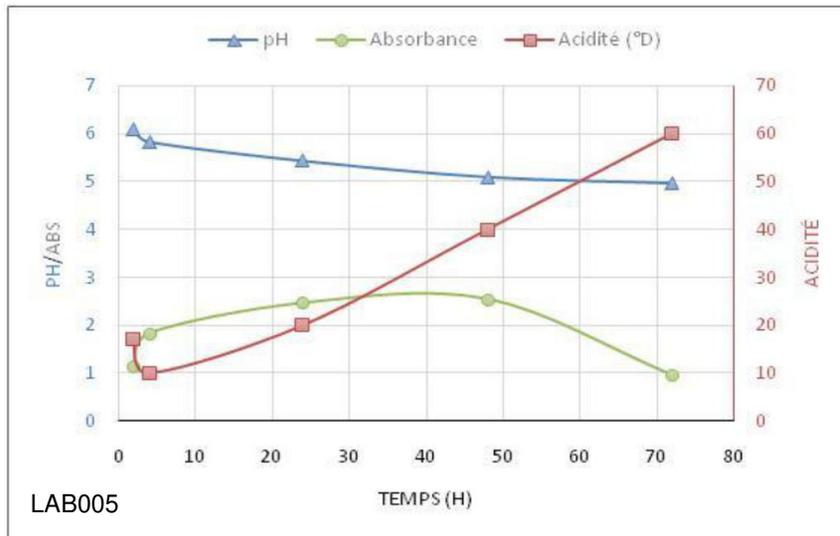
III.2.2.5 Caractérisation technologique et enzymatique

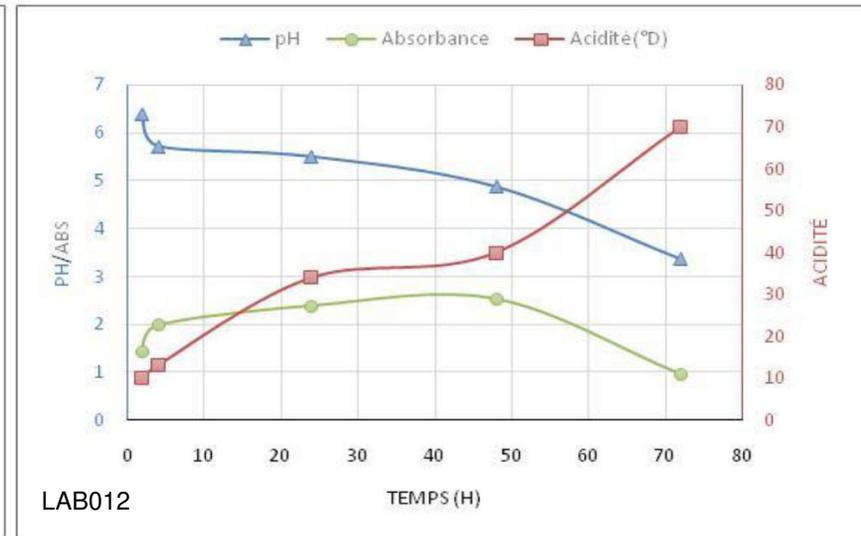
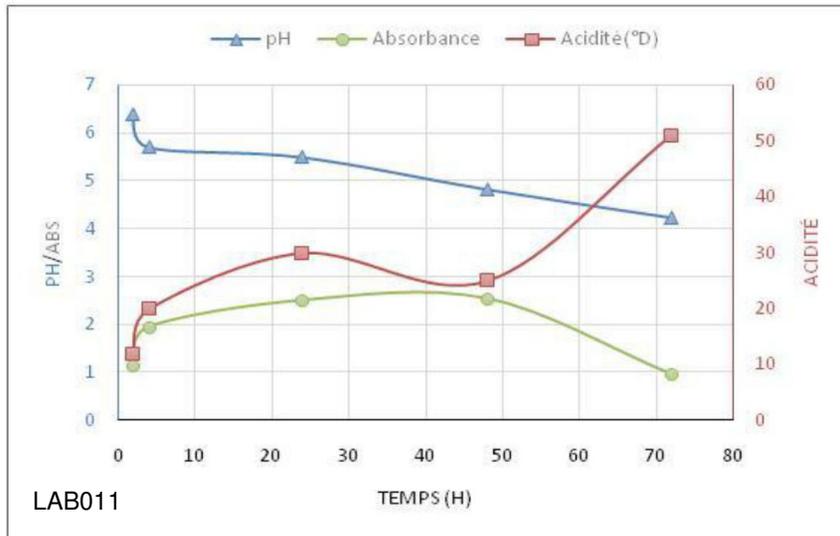
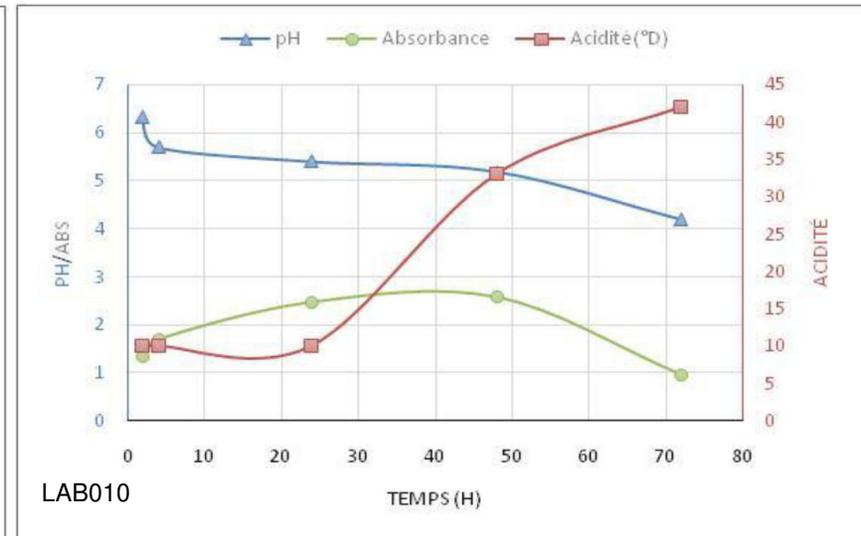
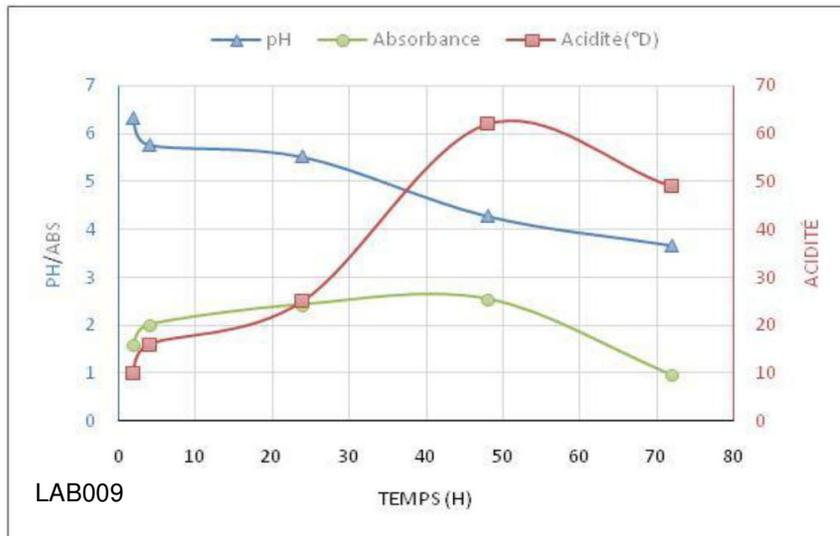
- **Pouvoir acidifiant et cinétique de croissance**

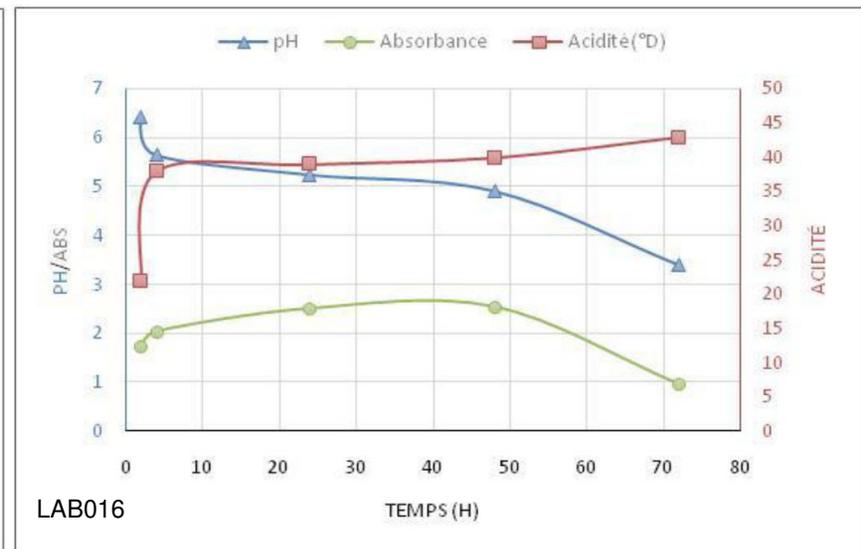
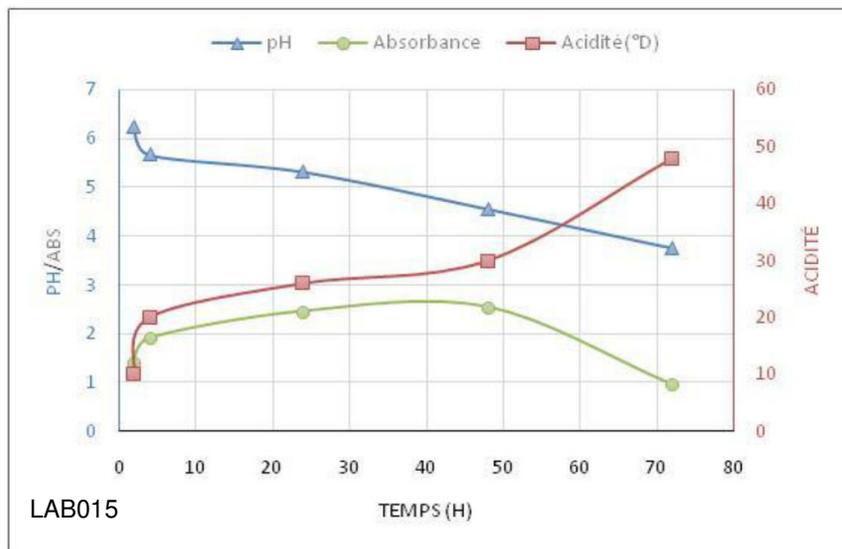
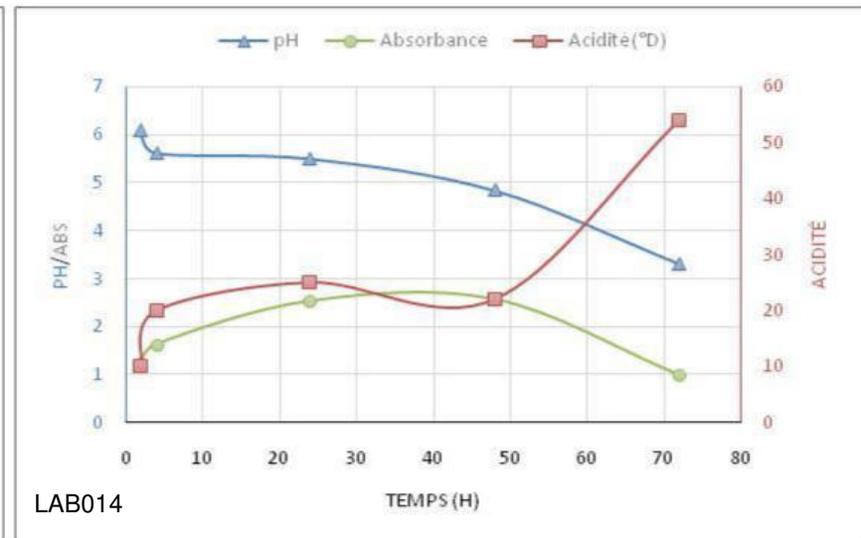
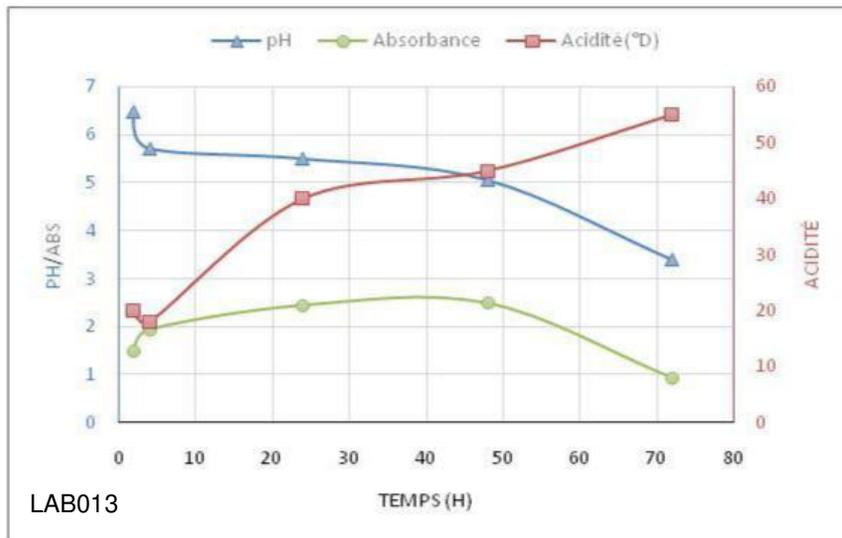
Les résultats obtenus de la mesure de l'acidité titrable au cours de la croissance des cultures sur le lait écrémé stérilisé par tyndallisation, après des intervalles de temps d'incubation à 37°C allant jusqu'à 72h, démontrent que la totalité des bactéries lactiques sélectionnées présentent une production progressive en acide lactique à partir de la fermentation du lactose. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement considérable et progressif du pH du milieu (pH initial 6,71). En effet, nous constatons des valeurs de pH qui balancent entre 3,18 et 4,96 avec une moyenne de 3,96 et un écart-type de 0,52. Notons que 36,84% (LAB011, LAB012, LAB013, LAB014, LAB015, LAB016 et LAB017) des souches ont abaissé le pH après 72 heures d'incubation au-dessous de la moyenne. Par ailleurs, les courbes obtenues nous permettent de retenir une corrélation négative avec la cinétique de croissance. En effet, l'augmentation du nombre des cellules bactériennes induit à l'abaissement du pH du milieu et de ce fait, à son acidification.

D'autre part, l'exploitation détaillée des courbes affichées sur les différents graphes de la **figure III.74**, nous permet de constater que la progression de la synthèse de l'acide lactique dans le milieu est en corrélation positive avec la cinétique de croissance et du temps. Notons que l'allure de la courbe de croissance des différentes souches, passe par plusieurs phases, notamment, une phase d'accélération qui se traduit par une croissance exponentielle et un taux maximal après 4h à 6h d'incubation ; une phase de ralentissement qui dure entre 6h et 36h, durant laquelle nous enregistrons la régression de la vitesse de croissance, l'épuisement du milieu de culture et le début d'autolyse des cellules bactériennes ; une phase stationnaire (entre 36h et 48h) qui reflète un taux de croissance nul ; et enfin, une phase de déclin qui se produit après 48h d'incubation, durant laquelle nous remarquons une diminution des cellules vivantes et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Soulignons ici que l'activité acidifiante varie entre un minimum de 40°D et un maximum de 70°D (1°D=0.1g d'acide lactique/l). Cette activité est importante entre 50h et 72h, exception faite pour les isolats LAB001, LAB002, LAB008 et LAB009, où nous percevons une diminution de l'acidité de 5 à 10°D après 50h d'incubation à 37°C. Ce constat, nous mène à révéler que les dix-neuf souches lactiques sélectionnées sont très actives et ont un très bon pouvoir acidifiant.









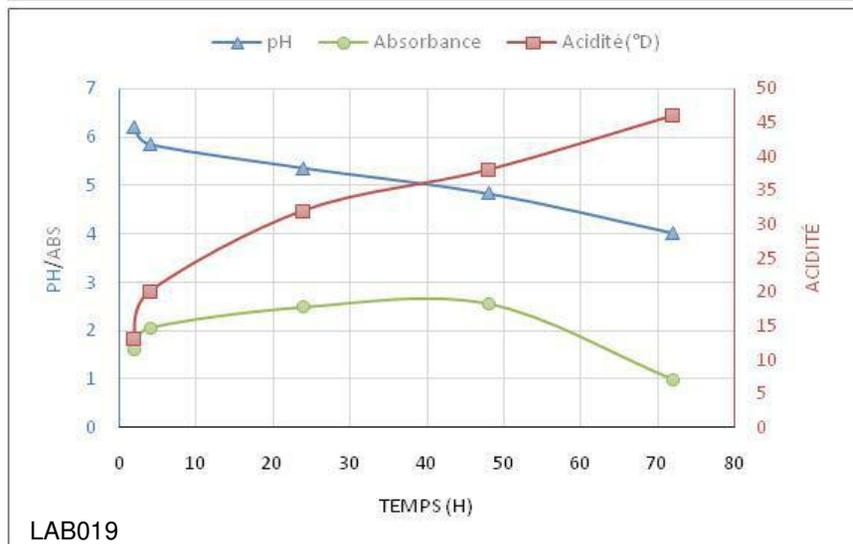
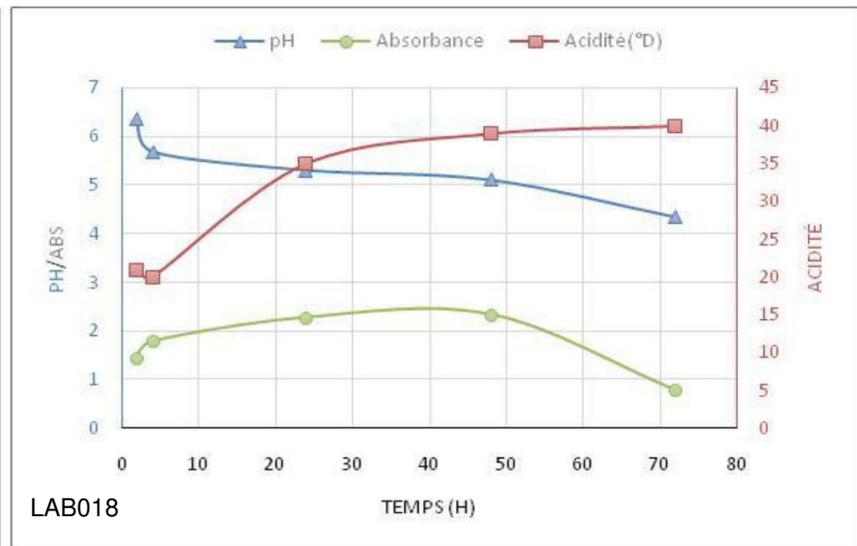
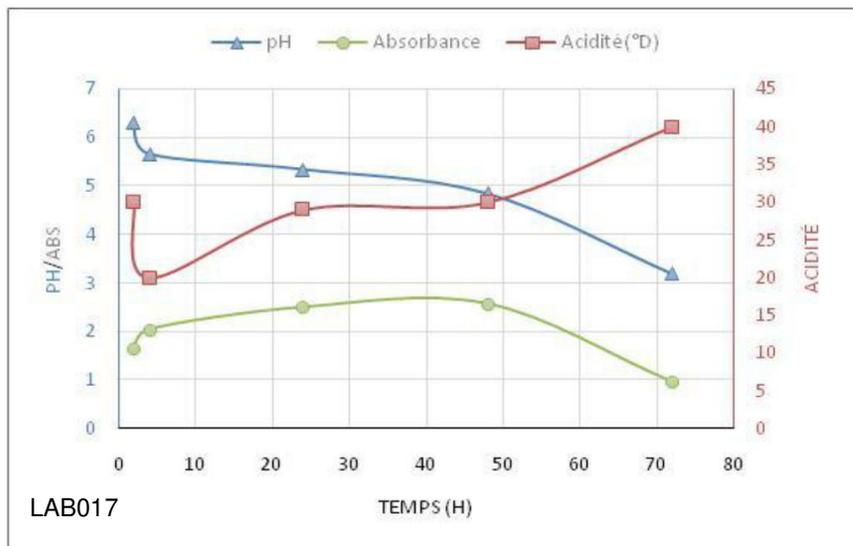


Figure III.74 : Progression de l'acidité Dornic et du pH en fonction de la cinétique de croissance des différentes souches lactiques.

▪ **Activité amylolytique, lipolytique et protéolytique**

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la majorité des souches étudiées sont capables d'hydrolyser l'amidon ; pendant que les isolats LAB015, LAB016, LAB017 et LAB018 ont présenté des taches brunes après révélation par ajout de la solution Lugol ; ceci signifie l'absence de l'enzyme amylase (**Tableau III.14**).

De même, il en ressort du tableau ci-après que quinze souches étudiées présentent une croissance sur milieu MRS-Tween₂₀₊₈₀ avec une faible activité lipolytique (les diamètres des halos clairs varient entre 6 à 7mm). Notons que les souches LAB001, LAB012, LAB013 et LAB017 sont lipase négative.

En ce qui concerne l'activité protéolytique, toutes les souches étudiées ont présenté une croissance sur milieu MRS-10% lait écrémé avec un caractère protéolytique bien distinct qui se traduit par l'apparition d'un halo clair autour du disque. Ces halos dévoilent un important diamètre qui oscille entre 11 et 15,5mm pour la plupart des isolats lactiques. Sur milieu YMA (Yeast Milk Agar) par contre, seules les souches LAB006, LAB007 et LAB010 ont montré une croissance avec une zone de protéolyse traduite par des halos qui varient entre 11 et 12mm de diamètre. De ce fait, nous constatons que l'activité protéolytique dépend de la souche et de la relation qui existe entre la composition du milieu de culture et l'expression de l'activité protéolytique par chaque souche lactique.

Tableau III.14 : Résultats des activités amylolytique, lipolytique et protéolytique

Code	ID espèce API 50 CHL	Activité technologique et enzymatique*			
		Amylolytique	Lipolytique (mm)	Protéolytique (mm)	
		Gélose à l'amidon	MRS-Tween ₈₀₊₂₀	MRS-10% lait écrémé	YMA
LB001	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	-	8 ± 0	-
LB002	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	6 ± 0,36	13,5 ± 6,36	-
LB003	<i>Pediococcus ssp</i>	+	6 ± 1,14	10,5 ± 0,70	-
LB004	<i>Weissella confusa</i>	+	6 ± 0,57	10,5 ± 2,82	-
LB005	<i>Pediococcus damnosus 1</i>	+	6 ± 0,08	15,5 ± 3,53	-
LB006	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	6 ± 2,29	15,5 ± 4,94	12 ± 3,53
LB007	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	7 ± 0,02	13 ± 2,82	11 ± 7,77
LB008	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	7 ± 0,16	13 ± 4,24	-
LB009	<i>Pediococcus ssp</i>	+	6 ± 0,41	11 ± 2,82	-
LB010	<i>Pediococcus pentasaceus 2</i>	+	6 ± 1,33	12 ± 4,24	11 ± 0,70
LB011	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	+	6 ± 0,14	13,5 ± 3,53	-
LB012	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	+	-	15 ± 1,41	-
LB013	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	+	-	9 ± 1,41	-
LB014	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	6 ± 1,15	13 ± 2,82	-
LB015	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	-	6 ± 1,40	13 ± 1,41	-
LB016	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	-	6 ± 0,22	12 ± 4,24	-
LB017	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	-	-	9,5 ± 0,70	-
LB018	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	-	7 ± 0,12	12,5 ± 3,53	-
LB019	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+	6 ± 0,15	8 ± 1,41	-

+ : test positive ; - : test négative ; * les résultats sont donnés par la moyenne de deux valeurs ± écart-type

- **Pouvoir texturant**

Bien que les résultats obtenus aient révélé que les souches étudiées sont capables de se développer sur le milieu hyper-saccharosé, elles ont formé de petites colonies à aspect normal.

- **Pouvoir épaississant et coagulant**

Il ressort des résultats obtenus, que dix-sept souches sur dix-neuf ont épaissi le lait en le rendant ferme et épais. L'épaisseur du gel formé varie entre 6 et 10mm selon la souche lactique. Les souches LAB001 et LAB002 ont donné des gels thixotropiques caractérisés par un aspect filant, lisse et non homogène ; pendant que la souche LAB004 n'a pas pu épaissir le lait.

Par ailleurs, les résultats du test du pouvoir coagulant ont montré que la totalité des isolats sont capables de coaguler le lait après 48h d'incubation à 37°C. Le *coagulum* formé a une consistance ferme et visqueuse. Le volume du lactosérum mesuré pour ces souches varie d'un minimum de 32% pour LAB013 à un maximum de 89,6% pour LAB006 (**Tableau III.15**). Notons que les isolats les plus performants sont LAB005, LAB006, LAB007 et LAB014.

Tableau III.15 : Résultats du pouvoir épaississant et coagulant des bactéries lactiques sélectionnées

Code	ID espèce API 50 CHL	Activité technologique	
		Pouvoir épaississant Épaisseur (mm)	Pouvoir coagulant Volume du lactosérum (%)
LB001	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+/-	44
LB002	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	+/-	56
LB003	<i>Pediococcus ssp</i>	8	45,22
LB004	<i>Weissella confusa</i>	-	32,8
LB005	<i>Pediococcus damnosus 1</i>	9	72
LB006	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	9	89,6
LB007	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	7	68
LB008	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	7	52
LB009	<i>Pediococcus ssp</i>	8	64
LB010	<i>Pediococcus pentasaceus 2</i>	7	56
LB011	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	10	53,6
LB012	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	8	40
LB013	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	9	32
LB014	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	10	88
LB015	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	9	48,8
LB016	<i>Lactococcus lactis ssp lactis2</i>	9	44
LB017	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	6	44,8
LB018	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	6	56
LB019	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	6	44,4

+/- : gel filant, lisse et non homogène ; - : test négative

- **Pouvoir aromatisant**

Toutes les souches isolées à l'exception de la souche LAB016 ont présenté une coagulation du milieu avec la formation d'un anneau rouge à la surface après l'ajout des deux réactifs VPI et VPII et une coloration rouge brique traduite par la formation d'acétyl-méthylcarbinol ce qui révèle la capacité des isolats sélectionnés à produire l'acétoïne.

- **Pouvoir autolytique**

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que cette activité est très variable d'une souche à l'autre. Selon **Ayad et al. (2004)**, l'activité autolytique est classée bonne si le pouvoir est compris entre 70 à 96%, faible entre 40 à 69% et pauvre entre 0 à 39%. D'après la présente échelle, 31,58% des souches ont une bonne activité autolytique (il s'agit de LAB006, LAB008, LAB009, LAB011, LAB014 et LAB015), 57,89% des souches ont une faible activité, et 10,53% ont une pauvre activité autolytique. Les résultats en détails, sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.16 : Pouvoir autolytique des souches lactiques

Code	ID espèce API 50 CHL	Absorbance initiale (A _i)	Absorbance après incubation (A _f)	Pouvoir autolytique (%)
LB001	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.510	0.20	60,78
LB002	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.497	0.29	41,65
LB003	<i>Pediococcus ssp</i>	0.539	0.18	66,6
LB004	<i>Weissella confusa</i>	0.496	0.22	55,64
LB005	<i>Pediococcus damnosus 1</i>	0.221	0.21	4,97
LB006	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.468	0.03	93,6
LB007	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.277	0.16	42,24
LB008	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.561	0.09	83,96
LB009	<i>Pediococcus ssp</i>	0.544	0.16	70,59
LB010	<i>Pediococcus pentasaceus 2</i>	0.382	0.19	50,26
LB011	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	0.505	0.01	98,02
LB012	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	0.202	0.13	35,64
LB013	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	0.434	0.14	67,74
LB014	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.446	0.12	73,09
LB015	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.363	0.05	86,23
LB016	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	0.487	0.19	61
LB017	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.484	0.20	58,68
LB018	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.484	0.17	64,87
LB019	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i>	0.411	0.24	41,61

III.2.2.6 Résultats de l'activité antifongique des bactéries lactiques

- **Résultat qualitatif (Méthode de deux stries ou double couches)**

La capacité des isolats lactiques à inhiber la croissance mycélienne des souches de *F. graminearum* a été définie comme étant l'activité ou l'effet anti-*F. graminearum* (anti-Fgr).

La recherche de cette activité a été faite *via* des techniques simples, rapides, fiables, efficaces et largement décrites dans la littérature notamment, celle de **Magnusson et al., 2003**, de **Dalié, 2010** et de **Kaktcham et al., 2018**. Nous rappelons que la potentialité d'inhibition fongique des souches a été évaluée comme étant : l'absence d'inhibition (-), la présence de l'inhibition à raison de 1 à 3% (+), la présence d'inhibition à raison de 3 à 8% (++) , tandis qu'une inhibition supérieure à 8% est représentée par (+++).

Les résultats du test qualitatif ont révélé que la totalité des isolats ont prouvé une activité inhibitrice significativement très efficace vis-à-vis des six souches de *F. graminearum* soit un taux d'inhibition de 100%. Ce résultat nous a poussé à refaire le présent test quatre (04) fois afin de le confirmer, et observer chaque boîte de Pétri à l'aide d'un stéréoscope (loupe binoculaire grossissement $\times 25$) à lumière transmise ; il ressort de ces observations que la germination des spores fongiques a eu lieu mais sans aucune croissance radiale, cette dernière a été inhibée par la sécrétion dans le milieu d'un métabolite extracellulaire par les bactéries lactiques testées (**Figure III.75_D**).

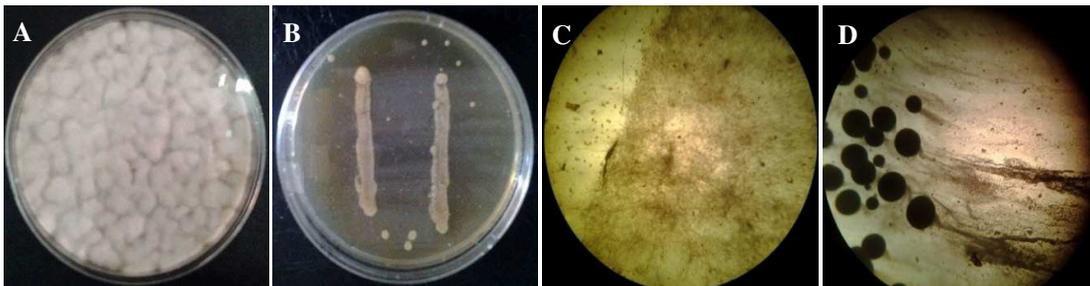


Figure III.75 : Résultats du test qualitatif de l'effet anti-F.gr des bactéries lactiques sélectionnées. (A) témoin ; (B) test positif ; (C, D) vue au stéréoscope à lumière transmise (G $\times 25$).

▪ **Résultat quantitatif (Co-culture sur milieu solide)**

L'activité antifongique des isolats bactériens a été ensuite confirmée par la méthode quantitative. L'analyse de la variance à deux critères de classification a mis en évidence des différences non significatives pour les facteurs bactérie lactique ($P_{\text{valeur}} = 0,82$) et espèce fongique ($P_{\text{valeur}} = 0,81$) ainsi que pour leur interaction ; ceci signifie que statistiquement, l'activité anti-Fgr des dix-neuf souches lactiques est égale et montre une homogénéité par rapport à la moyenne [$S = 18,35$; $CV = 19,09\%$] (**Figure III.76**). En effet, la quasi-totalité des bactéries ont pu éradiquer la croissance radiale des six souches de *F. graminearum* avec un taux d'inhibition de 100% ; exception faite pour l'isolat LAB015 vis-à-vis de Fgr1 (8%) et de Fgr27 avec 26%, pour l'isolat LAB018 contre Fgr1 et LAB019 contre Fgr3 avec 11%, par contre LAB018 n'a montré aucun effet inhibiteur contre Fgr3 (**Figure III.77**). Par ailleurs, l'observation au stéréoscope à lumière transmise démontre clairement l'inhibition de la croissance radiale des moisissures par les colonies bactériennes (**Figure III.78_D**).

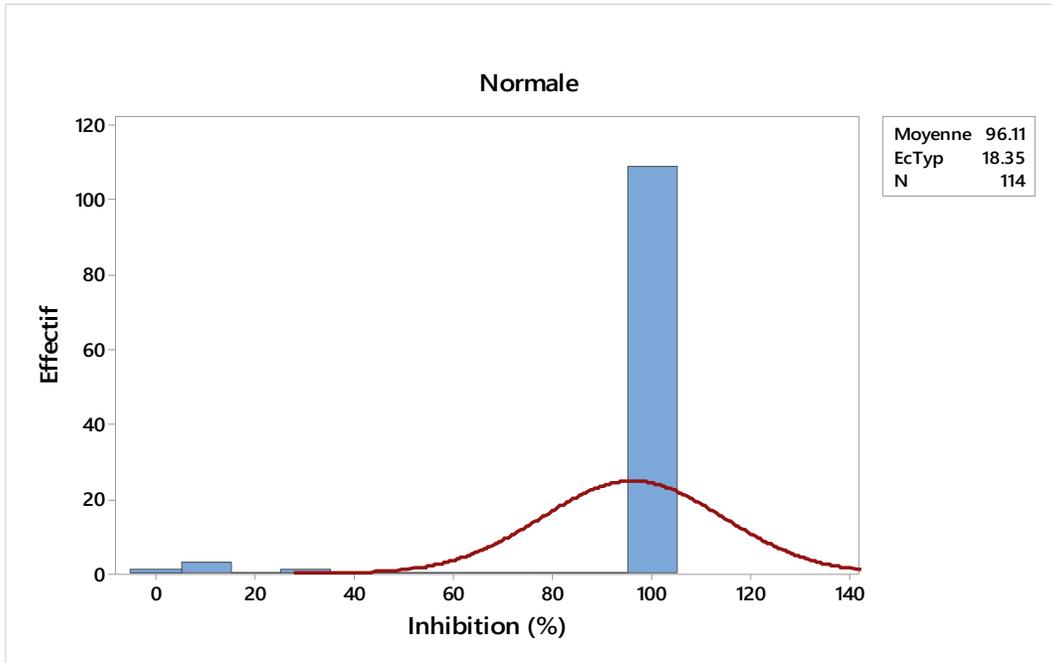


Figure III.76 : Distribution des bactéries lactiques testées en fonction de leur taux d'inhibition anti- *F.gr.*

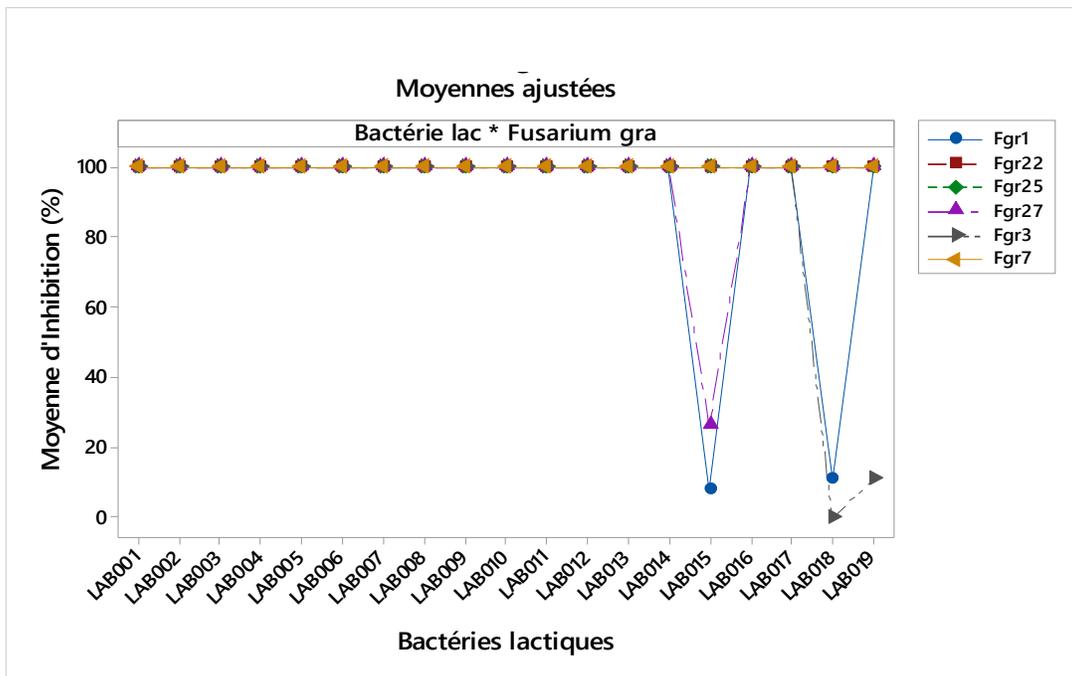


Figure III.77 : Effet de l'interaction entre les bactéries lactiques et les souches de *F. graminearum* sur le taux d'inhibition.

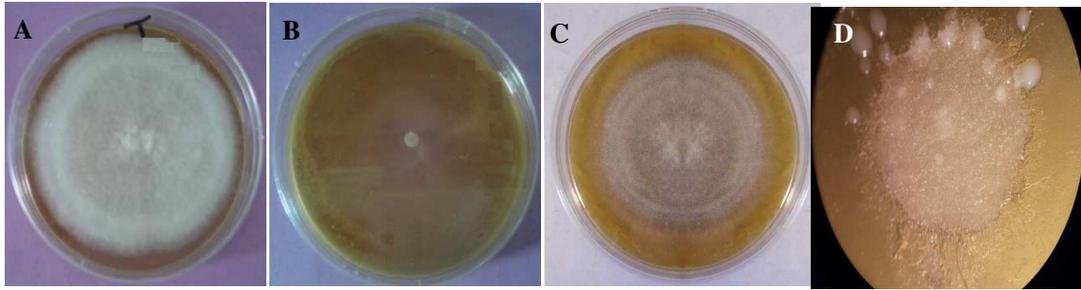


Figure III.78 : Résultats du test quantitatif de l'effet anti-*F.gr* des bactéries lactiques sélectionnées. (A) témoin ; (B) test positif ; (C) test négatif ; (D) vue au stéréoscope à lumière transmise (Gx25).

▪ **Résultat de l'activité antifongique des métabolites extracellulaires des LAB**

L'analyse de la variance à deux critères de classification du test de l'effet antifongique du métabolite extracellulaire de chaque souche lactique n'a pas révélé de différence significative entre l'effet des métabolites extracellulaires. L'écart-type est de 23,45 et le coefficient de variation est très élevé (29,81%), ce qui signifie statistiquement que les métabolites extracellulaires ont exercé une activité anti-*Fgr* hétérogène importante par rapport à la moyenne (**Figure III.79**). Signalons que le développement des souches de *F. graminearum* s'est révélé significativement différent en présence des métabolites extracellulaires bactériens (**Figure III.80**).

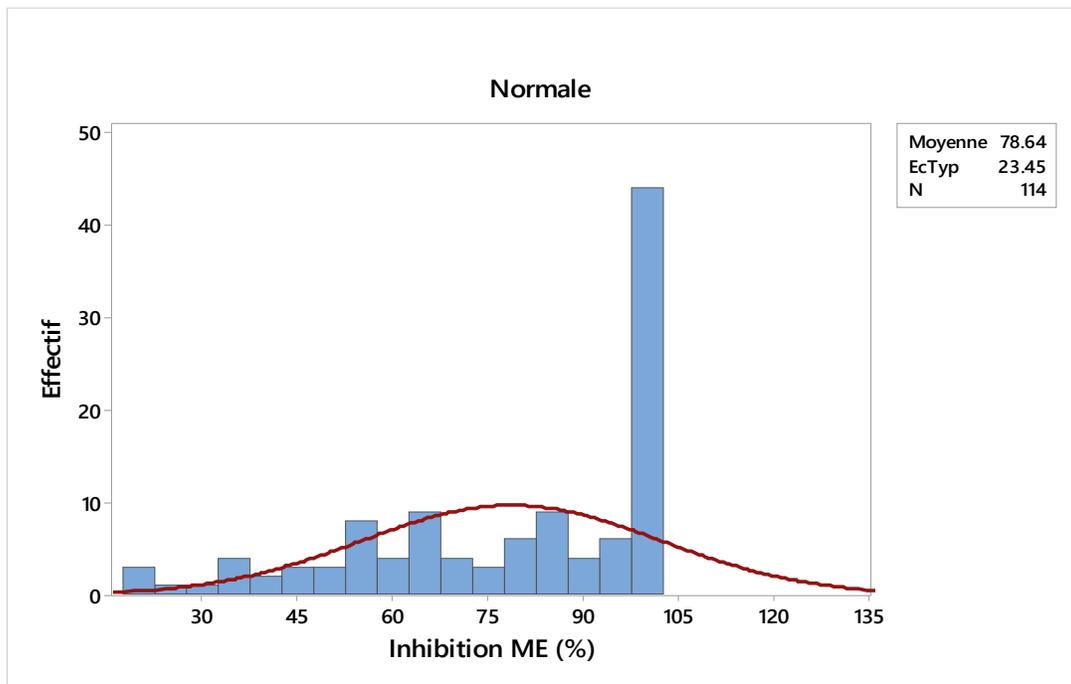


Figure III.79 : Distribution des bactéries lactiques testées en fonction du taux d'inhibition anti- *F.gr* de leur métabolite extracellulaire.

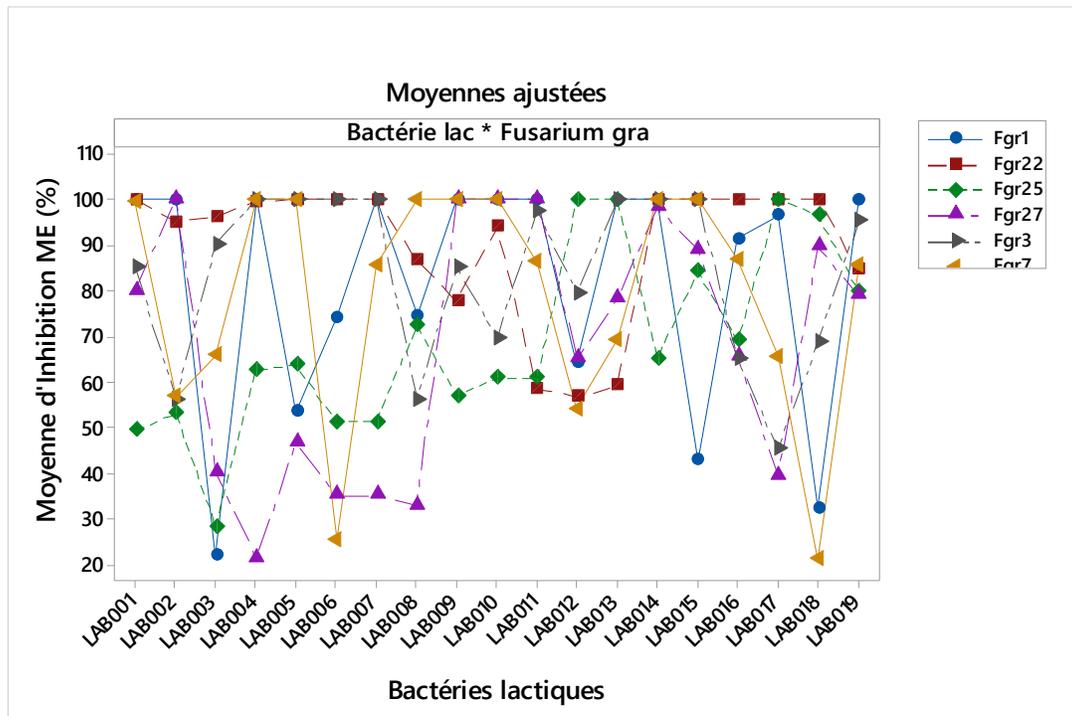


Figure III.80 : Effet de l'interaction entre les métabolites extracellulaires des bactéries lactiques et les souches de *F. graminearum* sur le taux d'inhibition.

A la lumière des résultats obtenus des trois techniques nous constatons que l'effet inhibiteur anti-*F. graminearum* des bactéries lactiques est dû à l'association des métabolites extracellulaires et à la présence des colonies bactériennes. En effet, d'après les résultats, nous remarquons que le taux d'inhibition a diminué en l'absence de ces dernières.

▪ Détermination de la nature des métabolites extracellulaires des LAB

Les tests des réactions chromogéniques effectués pour la révélation de la composition du métabolite extracellulaire de chaque isolat lactique se sont révélés positifs pour les révélateurs chimiques des amines (Ninhydrine) qui apparaissent après pulvérisation sous forme de bandes ou de taches violettes, des phénols qui sont rosâtres (FeCl_3) et des glucides qui sont de couleur rouge (Réactif de Molish) ; pendant qu'ils se sont montrés négatifs pour les lipides (Dichromate de potassium) (**Figure III.81**). Le **tableau III.17** résume les Rf et la nature des bandes révélées des métabolites extracellulaires des différentes bactéries lactiques étudiées.

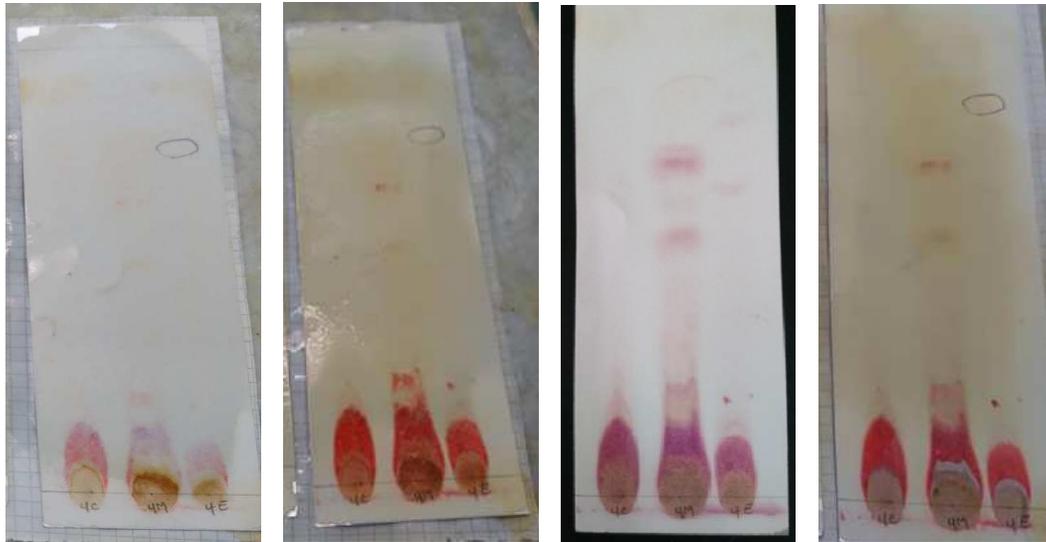


Figure III.81 : Plaques CCM de la nature des métabolites extracellulaires des LAB.

De gauche à droite : lipides ; Glucides ; Amines ; Phénols.

Tableau III.17 : Nature des métabolites extracellulaires produits par les bactéries lactiques

Révélateur	Solvant organique					
	Méthanol		Ethanol		Chloroforme	
	Rf	LAB	Rf	LAB	Rf	LAB
Ninhydrine	0,4	004/005/006	0,3	006/012	0,35	017
	0,5	002/003/004/005/006	0,4	008/012	0,5-0,59	001/015/011/019
	0,6	004/005/	0,5	004/006/008/012	0,66	001/019
	0,7	004/012	0,6	004/008/012	0,89	001/015/019
	0,8	002/003/009	0,7	004/012		
FECL ₃	0,3	005/006	0,2	017/018		
	0,4	004/005	0,3	016/018	/	/
	0,5	004/016/018	0,6	017/018		
	0,7	002/003	0,8	001/016/017		
Molish	0,4	001/005	0,1	015/017/018	0,5-0,59	001
			0,3	010/012/017	0,66	001
			0,7	012/017	0,89	001/015/019
			0,8	016/017		
Dichromate de potassium	/	/	0,2	012/017		
			0,3	012/014/017/019		
			0,5	012/017/018		
			0,6	012/017	/	/
			0,7	016/018		
			0,8	016/017/019		
			0,9	012/017/019		

/ : Pas de bande révélée.

III.2.2.7 Résultats de l'activité anti-DON

Cette étape avait un double intérêt : la confirmation des résultats antifongiques obtenus et l'étude de l'effet des bactéries lactiques sur la synthèse du DON. En effet, nous avons constaté une inhibition de la croissance de *F. graminearum* avec un taux de 100% par les 19 isolats lactiques sur milieu liquide gMRS. Par ailleurs, la capacité des LAB à inhiber la production des mycotoxine a été détectée par CCM. L'exploitation de ces plaques nous a montré que la production du DON par *F. graminearum* a été inhibée par les bactéries lactiques LAB006, LAB008, LAB012, LAB013, LAB017 (**Figure III.82**).

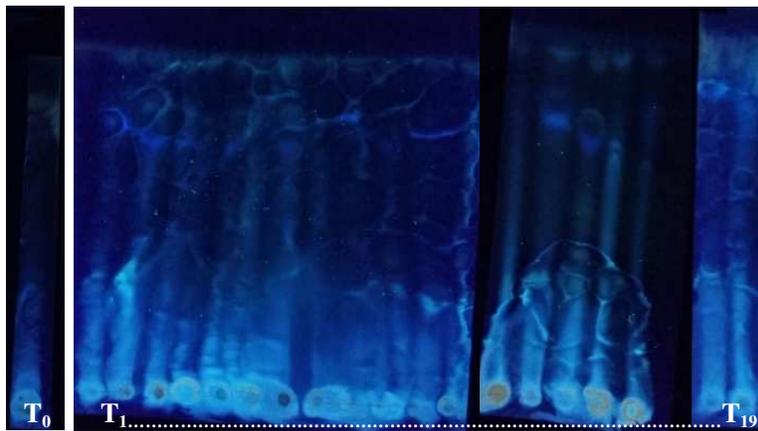


Figure III.82 : Plaque CCM de DON produit par *F. graminearum* en présence des LAB.
(T₀) témoin, (T₁...T₁₉) DON en présence des 19 LAB.

Chapitre IV :

Discussion Générale

DISCUSSION GENERALE

Dans ce quatrième chapitre, nous allons revenir dans un premier temps sur les principaux résultats du travail de notre thèse tout en les discutant ; ce qui nous permettra, dans un second temps, de reprendre les hypothèses de départ, de les confirmer ou de les infirmer.

Les moisissures jouent un important rôle dans la détérioration de la qualité sanitaire des céréales dans le monde entier, causant ainsi, de sérieuses pertes économiques comme le soulignent différents travaux dans le domaine (**Saladino et al., 2016 ; Luz et al., 2017 ; Kaktcham et al., 2018 ; Guimaraes et al., 2018a**). De plus, leurs toxines associées sont la cause de plusieurs problèmes de santé pour l'homme et l'animal. La contamination fongique et la production de mycotoxines dépendent de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques.

Dans la présente thèse, il était question dans une première partie, de soulever le voile sur la qualité sanitaire des blés durs et tendres locaux et importés, consommés par la population locale de la wilaya de Béchar ; ceci, *via* un diagnostic global des espèces fongiques et de leurs toxines associées tout en se focalisant sur *Fusarium graminearum* Chemotype DON. Et d'essayer dans une seconde partie, de trouver des agents biologiques sains ayant la capacité d'inhiber la croissance de cette espèce et la synthèse du DON.

Les résultats de la qualité physicochimique indiquent que les prélèvements analysés du blé dur et tendre (local et importé) renferment un pourcentage d'humidité relative¹ assez faible, ce qui permet de classer les différents échantillons dans la catégorie des produits peu hydratés. Cet avantage n'exclut pas leur contamination par une flore fongique xérotolérante prépondérante (**Gacem, 2011**). Ces résultats viennent confirmer ceux révélés par **Belyagoubi (2006), Amrouche (2007), Djaaboub (2010) et Riba et al. (2010)**.

Les résultats du pH, pour ce qui les concerne, montrent que les différents échantillons sont neutre voire légèrement acides. Par ailleurs, **Tabuc (2007)** a indiqué que les champignons peuvent se développer normalement à des pH compris entre 3 et 8 et ont une croissance optimale à des pH se situant entre 5 et 6. Ces propos nous permettent de dire qu'en raison de leurs acidités, les échantillons sont beaucoup plus exposés à une contamination fongique que bactérienne. Le pH peut avoir un effet critique sur la croissance fongique et sur la production de mycotoxine. La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9 avec une A_w comprise entre 0,85 à 0,98 et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C (**Reboux, 2006**).

¹ Quantité d'eau libre disponible dans l'échantillon et responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment notamment mycologique

Les résultats de l'analyse mycologique des 64 échantillons révélés par la méthode de dilution, ont montré une nette dominance du genre *Aspergillus* et *Penicillium* en nombre et en fréquence de contamination dans les blés locaux, suivi des *Cladosporium* et d'*Alternaria* ; pendant que les blés importés sont dominés par les genres *Fusarium* et *Penicillium* suivis des *Cladosporium* et des *Aspergillus*. Cette dominance semble être favorisée par une humidité élevée du grain au champ et un stockage prolongé. La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant des céréales a été reportée dans plusieurs travaux **Pitt et Christian (1968)** ; **Belyagoubi (2006)** ; **Amrouche (2007)** ; **Djaaboub (2010)** et **Riba et al. (2008 ; 2010)**. Notons que les espèces du genre *Aspergillus* notamment, *Aspergillus flavus* (espèce la plus fréquente) sont considérées comme des moisissures de stockage (**Christensen et al., 1982**). Les autres souches isolées des échantillons analysés appartiennent aux genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium* et *Fusarium* qui sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol (**Christensen et al ; 1982 ; Gasem et al., 2011**).

La contamination fongique des grains de blé s'explique par leur composition biochimique et influencée par la charge fongique initiale, les conditions climatiques au champ et celles du stockage dont l'humidité, la température et le système de ventilation jouent un rôle important voire primordial dans la variation du taux de cette contamination ; ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la mycoflore. Dans cette vision **Gasem et al.**, rapportèrent que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement liée aux conditions hydro-thermiques. Les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant 10 à 18% d'humidité ; toutefois nous notons que ce développement fongique est favorisé par la relation entre la température et l'humidité ; mais également, par le complexe fongique abritant le grain de blé.

Notons que 235 isolats ont été purifiés. Ils sont représentés par 42 espèces, en des fiches techniques informatives. Il s'agit : d'*Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Aspergillus clavatus*, *A. fischerianus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sydowi*, *A. terreus*, *A. ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. glandicola*, *P. italicum*, *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. paxilli*, *P. pinophilum*, *P. simplicissimum*, *P. thomii*, *P. variabile* and *Ulocladium botrytis*.

La caractérisation physiologique des six isolats de *F. graminearum* montre que la température optimale permettant une croissance optimale de cette espèce se situe entre 20°C et 25°C en milieu solide. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Booth en 1971** et **Pitt et Hocking en 2009** (24°C et 25°C). Aussi, selon les mêmes auteurs, les isolats de *F. graminearum* ne peuvent pas croître à 37°C et les résultats démontrés par la présente étude révèlent que la température maximale permettant la croissance de cette espèce est 30°C. Tandis que la température minimale est de 10°C. Le pH optimal permettant une croissance

optimale de *F. graminearum* est enregistrée à pH neutre (pH 7) à 25°C. Tandis que le pH minimal est de 3 à température optimale. Nous notons que ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Booth en 1971, Wheeler et al en 1991 et Pitt et Hocking en 2009**.

F. graminearum Schwabe est un phytopathogène ou moisissure des champs, donc il est logique qu'il nécessite pour sa croissance une A_w élevée et quand celle-ci diminue, elle entrave son développement. Bien que cette espèce peut être facilement isolée à partir des grains de céréales en stockage. Les tests effectués sur l'effet des différentes A_w ont affirmé que les isolats de *F. graminearum* ont une croissance optimale à 0.995 qui diminue avec la diminution de celle-ci. Dans ce sens, **Ramirez et al. (2006)** ont montré que l'activité d'eau optimale de la croissance pour *F. graminearum* est obtenue à une A_w 0.995, tandis que, le taux de croissance minimum pour ces souches est obtenu à 0.93. D'autres études ont montré que l' A_w optimale pour la croissance des espèces productrices de DON se situe à 0.995 (**Miller et al., 1983 ; Jackson et Bullerman, 1999 ; Birzele et al., 2000**).

Par ailleurs, les résultats obtenus ont clairement montré que la majorité des souches ne supportent pas un taux élevé en NaCl. Des essais réalisés ont montré qu'aux doses de 5 et 10 g.L⁻¹ de NaCl, les grains de blé ont germé facilement et la croissance des *Fusarium* n'a pas été affectée. En revanche, à 20 g.L⁻¹, la germination a été totalement inhibée, et la croissance des *Fusarium* a également été ralentie au point de nuire à leur détection (résultats non présentés). Le NaCl a donc été suggéré comme inhibiteur dans le milieu de détection des *Fusarium* (**Pitt et Hocking, 2009**).

La contamination des denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et animale, ou comme nous disons « *de la fourche à la fourchette* », par les moisissures pathogènes, continue d'affecter sérieusement la disponibilité et l'innocuité de l'approvisionnement alimentaire mondial. Ce problème se présente comme une question d'importance mondiale, tant sur le plan économique que sur le plan de santé publique. Bien que la situation soit différente entre les pays développés et ceux en voie de développement, plusieurs d'entre eux, ont pris conscience de l'ampleur de la question et accordent une attention grandissante aux problèmes posés par ces pathogènes (**Tozlovanu, 2008**). Devant ce constat et face à l'émergence d'un sentiment d'insécurité, l'on assiste de plus en plus à la mise en place des stratégies préventives limitant, ainsi, ces contaminations et dans le cas échéant, des traitements industriels visant à décontaminer les denrées alimentaires (**Scott, 1996 ; Bullerman et al., 2002 ; Park, 2002 ; Ryu et al., 2002**).

Dans ce but, de nombreux chercheurs se sont orientés vers des alternatives de lutte contre cette contamination, en l'occurrence, la lutte biologique fondée sur l'utilisation des micro-organismes. Cette voie de recherche connaît ces dernières années un regain de popularité dans le milieu scientifique, dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. En effet, la lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme. De plus, l'utilisation de plusieurs modes d'action par un seul agent antagoniste et sa capacité d'adaptation à la rhizosphère contribuent à la durabilité de la lutte biologique (**Cook, 1993**).

Actuellement, plusieurs produits de lutte biologique sont commercialisés et utilisés dans le monde (**Sharma et Dohroo, 1999**), cependant ils restent insuffisants. De ce fait nous avons essayé à travers cette étude, d'évaluer le pouvoir antagoniste probable de quelques espèces fongiques et de dix-neuf isolats lactiques vis-à-vis de *F. graminearum* Chemotype DON.

Partant des résultats obtenus des interactions fongiques, nous avons constaté que la présence d'*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. niger* mises en contact direct avec *F. graminearum*, a révélé une inhibition significative avec un taux d'inhibition moyen de 70,63%, 60% et 57,5% respectivement pour la technique 1, 72,71%, 65,63% et 92,29% respectivement pour la technique 2, 47,06%, 40,21% et 72,29% respectivement pour la technique 3 et 93,85%, 98,81% et 71,63% respectivement pour la dernière technique. Ces résultats confirment ceux obtenus par les travaux d'**Usha et al., en 2012**, qui ont montrés dans un essai d'antagonisme vis-à-vis de la souche pathogène *F. oxysporum* sur milieu PDA que les *Aspergillus* sp ont un effet inhibiteur avec un pourcentage d'inhibition de 42,5% après 6jrs d'incubation.

Les résultats obtenus par **Bashar et Chakma en 2014** au cours d'une étude de l'effet antagoniste de sept souches fongiques d'*A. niger* isolés à partir du sol, sur *F. oxysporum* et *F. solani* ont montré un pourcentage d'inhibition de 65,21 % et 56,25 % respectivement. De leur coté, **Fakhrunissa-Hashmi et Ghaffar** affirmèrent en **2006** qu'*A. niger* et *A. flavus* ont eu un effet antagoniste contre une dizaine d'espèces fusariennes testées. D'après ces travaux, nous pouvons dire que les *Aspergillus* sp, et plus particulièrement, *A. parasiticus*, *A. flavus* et *A. niger* sont capables d'accaparer le substrat et être un antagoniste compétitif important réduisant ainsi, la croissance mycélienne des espèces fusariennes pathogènes. Ceci à condition que l'agent antagoniste ne soit pas pathogène. **Paulitz et al. (1990)** ont mentionné que la constitution d'un substrat peut favoriser le développement de certains agents antagonistes vis-à-vis de l'agent pathogène tout en profitant de cette compétition pour les éléments nutritifs disponibles dans le substrat et accroître son potentiel d'inoculum.

Les résultats de la confrontation par contact direct sont appuyés par les résultats des essais de confrontation à distance de temps. Ils montrent que les trois espèces aspergillières ont révélé un pouvoir inhibiteur très efficace quand ils sont ensemencés 72h avant *F. graminearum*, donc la vitesse de croissance et le temps d'incubation de chaque souche joue un rôle primordial dans l'évaluation de l'interaction entre le pathogène et l'antagoniste. L'introduction de l'agent antagoniste au substrat 72h avant l'arrivée de l'agent pathogène est l'approche à privilégier (**Lewis et Papavizas, 1998**). Durant cette période, *Aspergillus* forment déjà leurs colonies ce qui leur permet d'occuper, prioritairement, le substrat bien que *F. graminearum* se développent rapidement sur les milieux classiques (PDA, MEA et Sabouraud). Ceci peut expliquer également les constats dressés par les résultats obtenus en ensemencant *F. graminearum* 72h avant l'ajout des *Aspergillus*.

Les travaux de **Sharma** réalisés en **2012** ont démontré au cours d'une étude *in vitro* et *in vivo* de l'interaction antagoniste entre *A. niger* et *F. oxysporum*, qu'*A. niger* a pu réprimer la croissance de la souche pathogène ainsi que la formation des spores. Il a prouvé

que le mécanisme de l'antagonisme employé par *A. niger* était la concurrence, la lyse, la pénétration et l'hyper-parasitisme. De plus, il a pu observer la lyse du mycélium et la production des chlamydospores qui se sont formés quand le champignon est sous stress.

Les *Fusarium* sont connus par leur aptitude à synthétiser des toxines en cas de stress ou en fin de croissance ; certaines d'entre elles augmentent la perméabilité cellulaire comme les lycomarasmines et les acides fusariques (**Corbaz, 1990**). Par ailleurs, une étude sur l'interaction entre *F. verticillioides*, *F. proliferatum* et *A. parasiticus* menée par **Marin et al. (2001)**, a révélé qu'*A. parasiticus* a pu réduire la croissance des *Fusarium* avec un pourcentage qui varie entre 6 et 36%, mais il n'a eu aucun effet sur la production de fumonisine B1. Au contraire, bien que les espèces fusariennes n'avaient pas d'effet répressur de la croissance d'*A. parasiticus*, elles ont pu réduire significativement l'accumulation d'aflatoxine B1 (30 à 93%). Dans ce sens, les résultats obtenus lors de notre travail ont montré la sécrétion de certains exsudats jaunes dans le milieu, cependant les essais réalisés nous ont permis de connaître l'origine ni la nature de ces molécules.

La confrontation à distance d'espace avait pour but de rechercher d'éventuelles molécules volatiles permettant la répression de la croissance de l'agent pathogène. Les résultats ont révélés un effet inhibiteur très important (entre 58,04% et 100%). Il en ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les *F. graminearum* et les *Aspergillus*, ces derniers ont pu exercer une activité inhibitrice. Ceci s'expliquerait par l'aptitude des *Aspergillus sp* à produire probablement, des substances volatiles qui sont capables de limiter le développement de l'agent pathogène.

Brzezinska et Jankiewicz (2012) ont montrés qu'*A. niger* est capable de synthétiser des chitinases à effet antifongique. Ce sont des enzymes capables d'hydrolyser la chitine, constituant principal des parois de certains champignons qui jouent un rôle important dans la nutrition et le parasitisme. Il est également, impliqué dans la morphogénèse fongique et à l'autolyse (**Pretsch et al., 2004**). Cette enzyme a eu une activité inhibitrice vis-à-vis de *F. culmorum*, *F. solani* et *Rhizoctonia solani*. Pendant que la croissance de *Botrytis cinerea*, d'*Al. alternata*, et de *F. oxysporum* n'as pas été affecté. **Mellon et al. (2007)** ont démontré que les protéases sécrétées par *A. flavus* peuvent également jouer un rôle dans la défense et la virulence fongique. Suite à ces résultats, nous pouvons déduire que le mécanisme d'interaction qui se déroule entre *F. graminearum* et *Aspergillus sp* est la compétition.

Pour ce qui est des interactions entre *Cladosporium sp.* et *F. graminearum*, les résultats obtenus des quatre techniques de confrontation montrent une nette réduction du diamètre moyen des agents antagonistes en contact avec le pathogène qui a accaparé l'intégralité du milieu tout en sécrétant une molécule jaune qui diffuse sur la gélose. En effet, les moisissures appartenant au genre *Fusarium* sont réputées par leur caractère toxigène (**Botton et al, 1990 ; Jeunot, 2005 ; Leslie et Summrell, 2006 ; Pitt et Hocking, 2009**). Ainsi, ces résultats reflètent l'état de compétition inter-espèces où nous remarquons une lutte des deux espèces pour l'utilisation d'une même ressource qui peut être de l'espace ou du même substrat et nutriments nécessaires à leur croissance

(Gastelum-Martinez, 2012). Les résultats montrent clairement que *F. graminearum* possède un avantage compétitif dans l'appropriation des nutriments et de l'espace lui permettant le contrôle et l'élimination des espèces antagonistes. En outre, cet état a un effet négatif sur la vitesse de croissance du pathogène par rapport au témoin, sachant, pertinemment, que *Cladosporium* a une vitesse de croissance moindre par rapport aux *Fusaria*.

D'autre part, **Iftikhar-Khan** et **Sarwr-Alam** ont montré en **2001**, que le filtrat de deux souches de *Cladosporium* peut réduire le flétrissement du pois-chiche causé par *F. oxysporum* de 55% pour la première souche et de 24% pour la seconde souche. Ceci indiquait qu'elles ont produit des métabolites antifongiques dans le filtrat. Par ailleurs, Les isolats de *Cladosporium* ont une activité antifongique meilleure (55% et 43%, respectivement) sur Czapek Dox modifié (contenant du nitrite de sodium qui est une meilleure source d'azote). Notons que les mêmes constatations ont été faites pour les interactions entre *P. janthinellum* et *F. graminearum*.

Suite à ces résultats nous suggérons que le choix des agents antagonistes et pathogènes dans le cadre des interactions biologiques est d'une importance primordiale car ceci influence beaucoup les résultats. Et de ce fait, un screening préliminaire s'avère nécessaire.

Plusieurs travaux réalisés depuis des années ont prouvé que les bactéries lactiques peuvent être une solution intéressante vis-à-vis des contaminations fongiques et leurs toxines associées (Mohran et al., 1984 ; Coallier-Ascah et Idziak, 1985 ; Magnusson et Schnurer, 2001 ; Strom et al., 2002 ; Sjogren et al., 2003 ; Schnurer et Magnusson, 2005 ; Rouse et al., 2007 ; Niderkorn et al., 2008 ; Dalié et al., 2010 ; Franco et al., 2011 ; Gerbaldo et al., 2012 ; Rayes, 2013 ; Ngang et al., 2015 ; Saladino et al., 2016 ; Al-Haik et al., 2017 ; Juodeikiene et al., 2018 ; Shehata et al., 2019 ; Martí-Quijal et al., 2020). Dans la présente étude, dix-neuf (19) isolats lactiques ont été examinées principalement, pour leur effet anti-*F. graminearum* et anti-DON, mais également pour leurs aptitudes technologiques.

L'étude des principaux caractères morphologiques et biochimiques ont montré que les 19 isolats sont des Cocci, Gram positif, immobiles, arrangées isolées, en diplocoque et en courte chainettes, dextrane et catalase négatif. En effet, les bactéries lactiques ne dégagent pas de gaz (absence d'effervescence), car elles n'éliminent pas facilement le peroxyde et donc, elles sont considérées comme micro-aérophiles (Dellaglio et al., 1994 ; Vignola, 2002). Selon Joffin et Leyral (1996), la classification primaire des isolats peut être réalisée selon la coloration de Gram, la morphologie cellulaire des colonies et leur mode d'association. L'identification macroscopique des isolats bactériens sur les différents milieux notamment MRS, M17, BHI et Slanetz, montre que la forme des colonies est sphérique, de couleur blanchâtre, ce qui correspond à la définition générale des bactéries lactiques (Franz et al., 1998).

La dégradation des carbohydrates a été étudiée par la galerie API 50 CHL. L'exploitation des résultats nous a permis d'identifier les différents isolats et de les regrouper en sept espèces : *Tetragenococcus halophilus*, *Lactococcus lactis ssp lactis 1*, *Pediococcus sp*, *Lactococcus lactis ssp lactis 2*, *Weissella confusa* et *Pediococcus pentosaceus 1* et *Pediococcus damnosus 1*. Il est, toutefois, recommandé de procéder à une identification moléculaire. En effet, l'étude réalisée par **Ouadghiri et al. (2009)** sur l'identification de 300 bactéries lactiques du lait cru et de ses dérivés « Lben » et « Jben » marocains par des méthodes biochimiques (API 50 CH), moléculaires (SDS-PAGE) et génotypiques (GTG)5-PCR a indiqué que l'identification par le système API manque de précision.

D'après les tests physiologiques effectués, les souches lactiques ont montré une résistance à une large gamme de facteurs abiotiques. Ceci reflète leur pouvoir de résistance aux stress rencontrés dans l'environnement ($10^{\circ}\text{C} < T^{\circ} < 45^{\circ}\text{C}$, thermo-résistance à 60°C pdt 30mn, $4,4 < \text{pH} < 6,5$ et $4,5\% < \text{NaCl} < 9,5\%$). Cette résistance est un avantage dans le biocontrôle car nous pouvons utiliser ces bactéries dans plusieurs conditions expérimentales dans les travaux futures. En effet, la sélection d'isolats les plus robustes est fondamentale pour la bio-préservation. De plus, la sélection doit être basée en premier sur son caractère GRAS (*generally regarded as safe*) et en second lieu, sur sa capacité d'adaptation aux conditions de préservation et de traitements argo-alimentaires.

La gélatinase est l'un des facteurs de virulence largement étudiée (**Del Papa et al., 2011**) ; il s'agit d'une Zinc-métalloprotéase extracellulaire qui agit sur une variété de substrats tels que la chaîne β de l'insuline, le collagène des tissus, le vasoconstricteur endothéline-1, ainsi que des phéromones sexuelles et leurs peptides inhibiteurs (**Waters et al., 2003 ; Fisher et al., 2009**). En outre, la gélatinase contribue au processus de formation de biofilm, ce qui peut accroître la capacité des entérocoques à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (**Del Papa et al., 2011**). Les résultats de recherche de la gélatinase ont montré que 100% des isolats ne dégradent pas la gélatine ce qui signifie qu'ils ne possèdent pas le génotype (GEL) : une protéase capable d'hydrolyser la gélatine, et donc, ne sont pas pathogènes. Ce critère est très important dans le domaine agro-alimentaire si nous comptons utiliser ces souches lactiques comme starters (**Marroki et Bousmaha-Marroki, 2014**).

Les amylases microbiennes sont des enzymes recherchées et utilisées dans les industries alimentaires en raison de leur productivité et thermo-stabilité (**Burhan et al., 2003**). Les résultats du pouvoir amylolytique ont dévoilé que les souches étudiées présentent une croissance sur le milieu à base d'amidon, mais quatre souches (LAB015, LAB016, LAB017, LAB018) n'hydrolysent pas l'amidon, ce qui signifie l'absence de l'enzyme amylase. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Thapa et al. (2006)** qui ont déclaré que l'ensemble des souches lactiques isolées des produits de la pêche (*Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus* et *Weissella confusa*) sont amylase positive.

L'action protéolytique des bactéries lactiques peut se manifester soit par une production d'enzymes exo-cellulaires qui accompagne le développement microbien, soit par une libération d'enzymes endo-cellulaires après la lyse des cellules bactériennes. Dans cette étude, sur MRS, des halos qui oscillent entre 11 et 15,5mm de diamètre ont été enregistrés pour les souches lactiques étudiées, à l'exception des souches LAB001, LAB013 et LAB019 qui ont exhibé un diamètre de protéolyse moins important (8,5mm en moyenne). Ainsi, sur milieu YMA, les souches LAB006, LAB007 et LAB010 ont présenté des halos entre 11 et 12mm de diamètre. L'activité protéolytique intervient dans les caractéristiques des produits laitiers fermentés, la protéolyse est à l'origine de l'apparition de nombreux composés aromatiques où leurs précurseurs jouent aussi un rôle dans la texture des fromages en produisant les exopolysaccharides (**Savoy et Hébert, 2001 ; Hassaine et al., 2007**). D'après les résultats obtenus, les bactéries isolées possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en acides aminés. Notons que la souche bactérienne est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse entre 5 et 15mm de diamètre ; de ce fait, les dix-neuf souches testées sont considérées comme étant protéolytiques.

Le calcul de l'épaisseur du lait écrémé ensemencé par les souches sélectionnées nous renseigne approximativement, sur la production et la quantité d'EPS libérée. Les résultats montrent qu'il y a une augmentation du volume du lait écrémé ensemencé dans tous les tubes. Dans ce sens, **Béal** et son équipe avancèrent, en **2008**, que certaines bactéries lactiques ont la capacité de produire des EPS dont leur accumulation provoque une augmentation de la viscosité des milieux. La production d'EPS dépend de la souche bactérienne (**Ricciardi et Clementi, 2000**), de la croissance bactérienne (**Ruas-Madiedo et Reyes-Gavilan, 2005**), de la température d'incubation (**Looijesteijin et al., 2001**), du milieu de culture, de la quantité d'O₂ que contient le milieu (**Cerning et al., 1990**) et de la durée de fermentation (**Chamba, 2008**). Une particularité sensorielle clé de la production de yaourt est la texture, principalement, entraînée par la coagulation protéique due à l'acidification par les bactéries lactiques. Les exopolysaccharides sont des polysaccharides exo-cellulaires qui peuvent être trouvés, soit fixés à la paroi cellulaire sous la forme de capsules, ou sécrétés dans le milieu extracellulaire ; les EPS jouent un rôle très important dans l'industrie laitière, car ces biomolécules améliorent la texture et peuvent agir comme épaississant, stabilisant, agent viscosifiant, émulsifiant ou gélifiant naturel.

Les souches lactiques productrices de composés aromatiques sont largement, recherchées dans les industries technologiques notamment laitières. Les résultats obtenus, ont montré que 18 isolats sur 19 ont un pouvoir aromatique puisqu'elles sont capables de synthétiser l'acétoïne (**Raynaud et al., 2003 ; Leroy et De Vuyst, 2004**). Le pyruvate se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l' α -naphthol (VPI) en donnant un complexe rouge. l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyle et/ou en acétoïne (**Monnet et al., 2008**). D'après **Phalip et al. (1994)**, l'acétoïne est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés (acide aspartique), comme il peut avoir comme origine la dégradation totale

ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique. Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car, chez ces dernières, le métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyle, d'acétoïne et de CO₂, participant ainsi, aux qualités aromatiques et texturales des produits (Raynaud et al., 2003).

En choisissant la voie de la fermentation lactique, les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique qui provoque une coagulation de lait. Elle peut être provoquée, soit par la transformation progressive du lactose du lait en acide lactique qui provoque l'abaissement du pH et la coagulation du lait, soit par un système d'enzymes protéolytiques qui ont la propriété de coaguler le lait. Les dix-neuf bactéries ont montré une capacité de coagulation du lait importante, allant de 32 à 89,6%.

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre, d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part, de doser simultanément l'acidité totale par la soude. Il semble que la plupart des espèces identifiées dans cette étude sont capables d'abaisser le pH entre 3,18 et 4,96 après 72h d'incubation. Une bonne culture starter productrice d'acide réduira le pH du lait de sa valeur initiale de 6,6 à 5,3 en 6h à 30°C (Boussouar, 2016). De ce fait, nous constatons que nos isolats ont un pouvoir acidifiant modéré.

Il est admis que l'autolyse entraîne la libération des constituants endo-cellulaire en l'occurrence les enzymes dont elles peuvent avoir un impact sur la saveur et l'arôme des fromages au cours de leur maturation. L'activité autolytique est classée selon Ayad et al. (2004) de bonne avec 70 à 96%, faible avec 40 à 69% et pauvre de 0 à 39%. D'après les résultats obtenus et selon cette échelle, 31,5% des souches ont une bonne activité autolytique, 52,6% des souches ont une faible activité, et 15,7% ont une pauvre activité autolytique.

La recherche de l'activité antifongique des dix-neuf souches lactiques par la méthode de double couche, a révélé la forte capacité de l'ensemble des bactéries lactiques à inhiber totalement la croissance mycélienne des *F. graminearum*. En effet, Zebboudj et al. (2020) montrent la capacité des bactéries lactiques du genre *Lactococcus lactis* à inhiber la croissance des *Fusarium* sur MRS avec un taux moyen de 60,5%. Il a été révélé que les composés antifongiques produits par les bactéries lactiques ne présentent une activité optimale que sous certaines conditions, notamment la température, le pH (Rouse et al., 2007), le milieu de culture et de la phase de croissance (Dalié et al., 2010). Dans ce sens, Batish et al. (1990) ont constaté que l'activité antifongique de *Lb. acidophilus* est maximale dans le milieu Elliker par rapport au M17 et MRS, et l'augmentation de la période d'incubation a entraîné une baisse dans l'activité antifongique. Sathe et al. (2007) ont démontré que l'activité antifongique de *Lb. plantarum* CUK501 est maximale à 30°C lorsque la culture est à la fin de la phase logarithmique. Dans le même contexte, Dalié a déclaré en 2010 que l'activité antifongique se trouve augmentée lorsqu'elle est cultivée sur

milieu MRS suggérant l'existence dans ce milieu de composés qui activeraient ou qui agiraient en synergie avec les entités produites par la souche lactique. Ces résultats sont en accord avec ceux de **(Laref et Gessas, 2013)**, qui ont montré que l'étude de la cinétique de production des métabolites antifongiques dans le milieu MRS a révélé une production majeure de ces métabolites pendant la phase de croissance, exponentielle et stationnaire. En outre, aucune diminution de l'accumulation de ces métabolites n'a été observée au-delà de la phase stationnaire.

Plusieurs chercheurs ont suggéré que l'effet antifongique exhibé par les bactéries lactiques est dû, soit à des acides organiques, soit à des protéines (**voir tableau I.3- Chapitre I**). Les résultats obtenus montrent clairement, la sécrétion des métabolites extracellulaires par les isolats étudiés. Les travaux de **Dalié (2010)** ont démontré que l'activité anti-*Fusarium* des bactéries lactiques n'était pas liée à la production d'acides organiques. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse de l'existence d'un ou plusieurs composés capables d'inhiber la croissance de *F. graminearum*, différents des acides organiques. En effet, la détermination de la nature des métabolites a révélé qu'il s'agissait de molécules gluco-protéiques et de phénols. La déperdition du taux d'inhibition enregistrée après plusieurs jours d'incubation est expliquée par plusieurs auteurs par la capacité des moisissures à dégrader les métabolites extracellulaires qui sont de nature protéique et à les utiliser comme source de carbone quand les éléments du milieu sont épuisés. Ceci, par le biais d'une panoplie d'enzymes (**Dalié, 2010**).

En outre, la variabilité de la zone d'inhibition par certains genres ou espèces semble plus active en phase de germination des spores ou conidies fongiques. En effet, cette étape est la phase de croissance la plus sensible à l'inhibition et la différence de la sensibilité observée entre les espèces des moisissures peut être liée à leur capacité à changer le métabolisme cellulaire en réponse à des conditions de stress. Et les résultats obtenus ont montré que les bactéries lactiques les plus performantes ont arrêté la croissance mycélienne des espèces fongiques juste après la germination de leurs spores. D'autre part, la variabilité des zones d'inhibition est probablement liée à la sensibilité des moisissures aux différents métabolites produits par les bactéries lactiques ainsi que leur concentration.

L'activité anti-DON des LAB sur milieu liquide permet à la fois d'étudier leur effet sur le développement de *F. graminearum* et sur sa capacité à produire DON. Les résultats obtenus ont montré que la croissance de *F. graminearum* a été totalement inhibée. La comparaison des plaques CCM test avec celles des témoins nous a permis de déduire que certaines souches ont pu inhiber la production de la toxine ou ont pu réduire sa concentration dans le milieu. Il est suggéré que ces résultats soient confirmés par des moyens plus sensibles notamment HPLC et ELISA quantitative. Les interactions entre les bactéries lactiques et les moisissures et leurs mycotoxines ont plusieurs résultats possibles : l'inhibition ou la dégradation, mais néanmoins, elles conduisent parfois à une inhibition de l'un de ces microorganismes et de ses métabolites. Cependant, **Hassan et Bullerman (2008)** ont indiqué une augmentation significative de la production de DON par *F. graminearum*

R4053 lorsqu'il est cultivé simultanément en milieu liquide avec *Lb. paracasei subsp. tolerans*.

A la lumière de ces résultats obtenus lors de cette étude, il apparaît clairement que les bactéries lactiques représentent une voie d'avenir pour la production des substances antifongiques utilisées dans la bio-conservation des aliments. L'analyse des propriétés physico-chimiques de cette substance à activité inhibitrice est nécessaire et peut servir de base pour orienter les futurs travaux de recherches. Les bactéries lactiques, de par leur innocuité, leurs propriétés technologiques et antimicrobiennes, semblent être de bonnes candidates pour la bio-conservation des produits alimentaires et la lutte contre les moisissures et leurs toxines associées.

Conclusion

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail de thèse, nous rappelons que l'objectif recherché qui était la réalisation d'une étude visant l'identification des contaminants fongiques des grains du blé local et importé de France, et de tenter de lutter biologiquement contre *Fusarium graminearum* chemotype DON. Pour ce faire, nous allons reprendre les hypothèses de départ que nous avons essayé de confirmer ou d'infirmer tout au long de la présente étude de thèse.

Hypothèse 1 : la croissance mycélienne dépend des facteurs de l'environnement ce qui influence la variabilité des espèces fongiques des blés.

Dans un premier temps, dans le cadre de l'évaluation sanitaire des blés consommés par la population locale de la wilaya de Béchar, nous avons eu à constater que ces blés abritaient une flore fongique diversifiée, dont les espèces appartenaient à plusieurs genres réputés par leur caractère toxigène. Nous citons, principalement, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria* ; ceci avec une fréquence et une dominance différente. Cette différence est due à leur provenance. En effet, les facteurs climatiques et les conditions de stockage influencent fortement la variabilité des espèces fongiques sur un substrat ou un autre. En focalisant notre investigation sur *F. graminearum* Chemotype DON et sur sa toxine associée, nous avons réalisé une forte contamination des blés, notamment importés, en déoxynivalenol. Les doses quantifiées dépassaient largement les seuils maximaux exigés en Europe. Cependant, nous enregistrons l'absence d'une réglementation nationale spécifiant les doses maximales en DON sur les grains de blé, malgré le fait que les importations en matière de blé soient de France, un pays qui connaît depuis des années d'importantes pertes économiques et sanitaires à cause de cette moisissure et de sa toxine.

Hypothèse 2 : les interactions fongiques pour le même substrat, influencent le développement d'une espèce fongique par rapport à une autre, tout en ayant un effet corrélatif positif, plutôt négatif, ou encore neutre

Outre les conditions de l'environnement, la présence de plusieurs espèces ou genres fongiques provoque différentes situations d'interactions entre elles ; ce qui mène à des coactions positives, négatives ou encore neutres. Dans le cas de cette étude, nous avons constaté que la croissance fongique dépend de l'espèce compétitive, de la vitesse de croissance des deux espèces fongiques et de la capacité de chacune d'elles à synthétiser des molécules secondaires bioactives, capables de limiter, voire d'inhiber la croissance de l'autre espèce. Cependant, le choix de l'agent antagoniste reste une préoccupation majeure. En effet, un agent antagoniste doit être sain et non toxigène étant donné qu'il est susceptible d'être utilisé comme agent de bio-conservation. Toutefois, bien que la production du DON dépend principalement du caractère toxigène de *F. graminearum* ; néanmoins, d'autres espèces que ce soit des espèces qui font partie du complexe fusarien ou

qu'elles appartiennent à d'autres genres, pourraient également, influencer la production du DON, par compétition ou au contraire en synergie avec l'espèce toxigène.

La connaissance des origines et des causes de la production des mycotoxines dans les céréales et du développement des moisissures nous permet de mettre au point des modes de conduite agricoles et de transformations agroalimentaires plus sûrs, permettant, ainsi, de prévoir la contamination fongique et d'assurer une alimentation saine, notamment, en ce qui concerne les cultures stratégiques.

Hypothèse 3 : les grains de blé abritent des microorganismes sains, notamment des bactéries lactiques, capables de limiter, voire éliminer les moisissures et leurs toxines associées.

D'autres microorganismes méritent notre attention. Il s'agit des bactéries lactiques qui sont reconnues comme agent de préservation par excellence. Ceci à cause de leur caractère GRAS et leur capacité non seulement, de s'adapter aux conditions extrêmes mais également à leur pouvoir antifongique. Lors de la présente étude, nous avons constaté une activité antifongique importante des bactéries lactiques isolées des mêmes biotopes que le pathogène, allant jusqu'à 100% d'inhibition. De plus d'autres avantages technologiques et enzymatiques ont été enregistrés. Pour ce qui est de leur effet anti-DON, la chromatographie sur couche mince ne nous a pas permis de quantifier cette toxine dans le milieu de culture et de ce fait de déduire le mode d'intervention utilisé par les bactéries lactiques contre DON : élimination ou dégradation, ou plutôt répression de sa synthèse. Il est donc, suggéré d'utiliser HPLC, et le cas échéant, ELISA quantitative.

Analyser un risque lié aux moisissures et à leurs toxines associées consiste d'abord, à évaluer la probabilité de son apparence, de sa sévérité et de ses effets néfastes probables sur la santé. Puis, d'élaborer des solutions saines afin de minimiser, voire, éliminer ce risque. Dans ce contexte, notre travail de thèse, contribue à trouver des solutions permettant la minimisation des risques liés à la fusariose du blé et au DON. Néanmoins, il faudra rappeler que cette étude, bien que prometteuse, ne représente pas une large gamme de situations et mérite d'être approfondie et élargie.

Ce présent travail de thèse nous apparait comme un travail préliminaire ouvrant la voie à de nombreuses perspectives de recherche. Ces perspectives concernent trois volets qui sont :

1. La validation des résultats obtenus lors de ce travail, par :

- l'étude d'un grand nombre de souche de *F. graminearum* ;
- l'étude de *F. culmorum* Chemotype DON ;
- le dosage du DON par des techniques plus sensibles ;
- l'identification moléculaire des espèces fongiques et bactériennes ;
- le renforcement du contrôle phytosanitaire.

2. Des études d'impact sur l'effet :

- du DON sur la croissance des *F. graminearum* et autres espèces fongiques ;

- toxicologique du DON sur les animaux pour spécifier la dose maximale permise ;
- combiné des facteurs abiotiques et biotiques sur la croissance de *F. graminearum* et la biosynthèse du DON, mais également sur les interactions microbiennes ;
- enfin, des autres moisissures du complexe fusarien en compétition ou en synergie, ou plus largement, du complexe fongique, sur la synthèse du DON.

3. *L'étude de la cinétique de l'élimination ou de la dégradation du DON par les bactéries lactiques ou les autres espèces fongiques.*

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adnan A.F.M. and Tan I.K.P. (2007).** Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology* 98:1380-1385. doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.034.
2. **Al-Haik W.M., Bawazir A.M.A., Mohammad Aly M., Al-Haddad A.M. and Shantaram M. (2017).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against toxigenic fungi. *Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.* 5(11): 1-8. <https://doi.org/10.20546/ijcrar.2017.511.xxx>
3. **Alvarez C.L., Somma S., Proctor R.H., Stea G., Mulè G., Logrieco A.F., Fernandez-Pinto V. and Moretti A. (2011).** Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* 3:1294-1309. doi.org/10.3390/toxins3101294.
4. **Amrouche A. (2007).** Etude mycologique et mycotoxicologique du blé tendre local et importé et ses dérivés de meunerie (farine et son) stockés dans la région de Béchar. Extraction et détection des Aflatoxines par méthode chromatographique. Mémoire de magistère. CUB. Béchar. Algérie. 120 p
5. **Andersen A.L., (1948).** The development of *Gibberella zea* headblight of wheat. *Phytopathology* 38 : 595- 611.
6. **Andreas K., Harald S., Kurt B.C. and Wayne T.S. (2008).** La fusariose : maladie du blé *Fusarium spp.* et *Microdochium nivale*. BASF: The Chemical Company.
7. **Andrews S. and Pitt J.I. (1986).** Selective media for *Fusarium* species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(6) : 1235-1238.
8. **Arthur J.C. (1891).** Wheat scab. *Indiana Agricultural Experimental Station Bulletin* 36:129-132.
9. **Atanasoff D. (1920).** *Fusarium* Blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research* 20 : 1- 32.
10. **Ayad E.H.E., Nashat S., El-Sadek N., Metwaly H. and El-Soda M. (2004).** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology* 21(6): 715-725. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.009>
11. **Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005).** Antifungal activity of a saharan *Actinomyces* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Med. Myco.* 15, 211-219
12. **Baek E., Kim H., Choi H., Yoon S. and Kim J. (2012).** Antifungal activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in rice cakes. *Journal of Microbiology* 50: 842-848. [doi:10.1007/s12275-012-2153-y](https://doi.org/10.1007/s12275-012-2153-y)
13. **Bai G.H., Plattner R., Desjardins A.E. and Kolb F. (2001).** Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding* 120: 1-6. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00562.x>
14. **Balciunas E.M., Castillo-Martinez F.A., Todorov S.D., Gombossy de Melo-Franco B.D., Converti A., and Pinheiro de Souza Oliveira R. (2013).** Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32: 134-142.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
15. **Balzer A.P.E. (2003)**. Les trichothécènes : Nature et origine. Thèse de doctorat. Ecole nationale Vétérinaire. Toulouse. France. 117p.
 16. **Bashar M. and Chakma M. (2014)**. *In vitro* control of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* the causative agent of brinjal wilt. *Dhaka University Journal of Biological Sciences*, 23(1): 53-60. <https://doi.org/10.3329/dujbs.v23i1.19826>.
 17. **Batish V.K., Lai R. and Grover S. (1990)**. Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R. *Food Microbiology*. 7 (3): 199-206. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(90\)90025-D](https://doi.org/10.1016/0740-0020(90)90025-D).
 18. **Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P. (2008)**. Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. Pp :661-765.
 19. **Belal J.M., Zaiton H. and Sajaa K.S., (2011)**. Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* TE007 *Pediococcus pentocasaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasei* D5 on selected food. *Journal of food science* 76 (7): 493-499. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x>.
 20. **Belarbi F. (2011)**. Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Mémoire de magistère. Université d'Oran Es Senia. Algérie. 129p.
 21. **Belyagoubi L. (2006)**. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magistère. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. Algérie. 108p.
 22. **Benbrook et Mathews V. (1996)**. Studies on the genus *Pythium*. The University of North California press. Baltimore.
 23. **Benhamou N. and Chet L. (1996)**. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86(4) : 405-416.
 24. **Bennett J.W. (1977)**. An Overview of the Genus *Aspergillus*. Pp: 1-17. <https://www.caister.com/openaccess/pdf/aspergillus1.pdf>
 25. **Bilai V. I. (1955)**. The *Fusaria* (Biology and Systematics). Publication Academy of Science Ukraine SSR, Kiev, USSR.
 26. **Birzele B., Prange A. and KrÄmer J. (2000)**. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters, *Food Additives & Contaminants* 17 (12): 1027-1035. [doi: 10.1080/02652030050207828](https://doi.org/10.1080/02652030050207828)
 27. **Bondy G.S. and Pestka J.J. (2000)**. Immunomodulation by fungal toxin. *J. Toxicol. Env. Health part B*. 3, 109-143. <https://doi.org/10.1080/109374000281113>.
 28. **Booth C. (1971)**. The Genus *Fusarium*. Kew: Common wealth Mycological Institute. United Kingdom. 237p.
 29. **Bottalico A. (1998)**. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80 (2): 85-103. <https://www.jstor.org/stable/41997909>
 30. **Botton B., Bretion A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond**

- P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2^e Ed. Masson. Paris, Milan, Barcelone et Mexico. 512 p.
31. **Boudra H. et Niederkorn V. (2004).** Conservation des souches de bactéries fermentaires par cryogénéisation. Centre de Recherche de Clermont-Theix. Champanelle. France.
32. **Bouneghou S. (2010).** L'effet inhibiteur de *Pythium sp.* sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata*, Université Mentouri Constantine, Alger
33. **Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. (1991).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Vol III : le contrôle microbiologique. Ed. Lavoisier. Paris. 451p.
34. **Bourgeois C.M. et Larpent J.P. (1996).** Microbiologie alimentaire : tome 2 -Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec & Doc. Lavoisier. 523p.
35. **Boussouar N. (2016).** Caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest algérien. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid. Tlemcen. Algérie. 238p.
36. **Boutigny A.L. (2007).** Etude de l'effet de composés du grain de blé dur sur la régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes B : purification de composés inhibiteurs, analyse des mécanismes implique. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1. France. 404p.
37. **Boutigny A.L., Ward T.J., Van Coller G.J., Flett B., Lamprecht S.C., O'Donnell K. and Viljoen A. (2011).** Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology* 48(9): 914-20. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.05.005>.
38. **Brown N.A., Urban M., Van De Meene A.M.L. and Hammond-Kosack K.E. (2010).** The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet-to-spikelet colonisation in wheat spikes. *Fungal biology* 114: 555-571. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.006>.
39. **Brzezinska M.S. and Jankiewicz U. (2012).** Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Curr Microbiol* 65: 666-672. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0208-2>
40. **Bukhari S. A., Salman M., Numan M., Javed M. R., Zubair M. and Mustafa G. (2020).** Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. *Molecular Biology Reports* 47(3):1871-1881. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05281-1>.
41. **Bullerman L.B., Ryu D. and Jackson L.S. (2002).** Stability of fumonisins in food processing. *Adv Exp Med Biol*. 195-204. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0629-4_20.
42. **Burgess L.W., Klein T.A., Bryden W.L. and Tobin N.F. (1987).** Head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* Group I in New South Wales in 1983. *Australasian Plant Pathology* 16: 72-78. <https://doi.org/10.1071/APP9870072>.
43. **Burgess S.M., Delannoy M. and Jensen R.E. (1994).** MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell. Biol.* 126(6):1375-1391. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.6.1375>.
44. **Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer C., Ashabil A. and Osman G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus Sp.* Isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38 (10): 1397-1403.

- [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00037-2).
45. **Cabo M.L., Braber A.F. and Koenraad P.M.F.J. (2002)**. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot.* 65(8) :1309-1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1309>
 46. **Cahagnier B. (1998)**. Qualité microbiologique des grains et teneurs en ergostérol. *Cahier Scientifiques et Techniques* (Janvier/Février) : 5-15.
 47. **Caron D. (1993)**. Les Fusarioses. In *Maladies des blés et orges*. ITCF : 30-39.
 48. **Carr F.J., Chill D. and Maida N. (2002)**: The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol* 28 (4): 281-3703. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>.
 49. **Carruthers R.I. and Soper R.S. (1987)**. Fungal diseases. In: Fuxa J.R. and Tanada Y(Eds). *Epizootiology of insect diseases*. Ed. John Wiley & Sons. New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore. Chapter 12: 357-416.
 50. **Carter J.P., Rezanoor H.N., Holden D., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P. (2002)**. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* 108(6): 573-583. <https://doi.org/10.1023/A:1019921203161>.
 51. **Cavaglieri L. and Etcheverry M. (2002)**. Impacto de la competencia interespecifica sobre el crecimiento y la produccion de fumonisina B1 : seleccion de un potencial agente de biocontrol. In: Guzman G. and Mata G. (Eds.). *Abstracts of the 4th Latinamerican Mycology Congress*. Latinamerican Fungi Studies. Xalapa / Veracruz /Mexico. 404p.
 52. **Cerning J. (1990)**. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiolo. Rev.* 87 (1-2) :113-130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04883.x>
 53. **Chamba F.J. (2008)**. Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. Pp : 787-813.
 54. **Champeil A. (2004)**. Contribution à la compréhension des effets des systèmes de culture sur l'infection des cultures de blé tendre d'hiver par la fusariose et la contamination des grains par les mycotoxines associées Institut National Agronomique. Thèse de doctorat. Paris-Grignon UMR d'Agronomie INRA/INA P-G. France. 246p.
 55. **Champeil A., Doré T. and Fourbet J. (2004)**. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166 (6): 1389-1415. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.004>
 56. **Chavez E.R. (1984)**. Vomitoxin-contaminated wheat in pig diets: pregnant and lactating gilts and weaners. *Can. J. Anim. Sci.* 64 (3) : 717-723. <https://doi.org/10.4141/cjas84-079>
 57. **Chehri K., Maghsoudlou E., Asemani M. and Mirzaei M.R. (2011)**. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with head blight of wheat in Iran. *Pak. J. Bot.* 43 (5): 2607-2611.
 58. **Chelkowski J., Wisniewska H., Adamski T., Golinski P., Kaczmarek Z., Kostecki M., Perkowski J. and Surma M. (2000)**. Effects of *Fusarium culmorum* head blight on mycotoxin accumulation and yield traits in barley doubled haploids. *J. Phytopathol.* 148 (9-10): 541-545. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00557.x>.
 59. **Chen H.K., Wang G. and Jiang X. (1982)**. Studies on *Fusarium* species infecting spikes of

- wheat and barley in Zhejiang Province. *Acta Phytopathologica Sinica* 12: 1-12
60. **Chen Y.S., Yanagida F. and Shinohara T. (2005).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology* 40 (3): 195-200. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x>
 61. **Chen L., Guangyu W., Tong B., Yunbin Z., Yixin W., Ming L. and Xiukun L. (2010).** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 879-888. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0247-4>
 62. **Chermette R. et Bussieras J., (1993).** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Ed. Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. France.
 63. **Chilaka C.A., De Boevre M., Atanda O.O. and De Saeger S. (2018).** Quantification of *Fusarium* mycotoxins in Nigerian traditional beers and spices using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Food Control* 87 : 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.028>
 64. **Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamberet G., Lenoir J. et Tourneur C. (1984).** Les phénomènes microbiologiques et la biochimie de l'affinage in : *Le Fromage*. Tech & Doc. Lavoisier. Paris.
 65. **Christensen C.M., Meronuk R.A. and Souer D.B. (1982).** Microflora. Chapter 9. In: Storage of cereal grains and their products (Christensen C.M.ED), American Association of cereal chemists, st, Paul : 219-240.
 66. **Cizeikiene D., Juodeikiene G., Paskevicius A. and Bartkiene E. (2013).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*. 31: 539-545. [doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.004](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004)
 67. **Coallier-Ascah J. (1981).** Effect of interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on the production of aflatoxin. Thèse de doctorat. Montréal. Québec. Canada.
 68. **Coallier-Ascah J. and Idziak E.S. (1985).** Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on Production of Aflatoxin. *Applied and environmental microbiology* 49 (1): 163-167.
 69. **Codex Alimentarius (2004).** Directives générales sur l'échantillonnage. CAC/GL 50-2004. 1-77.
 70. **Cook R.J. (1993).** Making Greater Use of Introduced Microorganisms for Biological Control of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31:53-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000413>
 71. **Corbaz R. (1990).** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.286p.
 72. **Crowley S., Mahony J. and van Sinderen D. (2013).** Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiologica* 58: 291-299. [doi:10.1007/s12223-012-0209-3](https://doi.org/10.1007/s12223-012-0209-3).
 73. **Cuero R.G., Smith J.E. and Lacey J. (1987).** Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* on irradiated grains. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89 (2): 221-226. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(87\)80156-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80156-0).
 74. **Curl N., et Tmelove L. (1986).** Lutte chimique et biologique contre *Erwinia carotovora*

- subsp. carotovora*, *Fusarium roseum* var. *sambucinum* et *Phytophthora erythroseptica*, agents des pourritures des tubercules de pomme de terre.
75. **Daami-Remadi M. et El Mahjoub M. (2001)**. Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. l'INRAT* 74 : 167-186.
 76. **Dalié D.D.K. (2010)**. Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactique autochtone de maïs. Thèse de doctorat. Ecole Doctoral Science de la Vie et de la Santé, université de Bordeaux. France.
 77. **Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Atanasova-Penichon V. and Richard-Forget F. (2010)**. potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) isolated from maize leaf to suppress Fumonisin-producing fungal growth. *Journal of Food Protection* 73(6): 1129-1137.
 78. **Dalié D., Pinson-Gadais L., Atanasova-Penichon V., Marchegay G., Barreau C., Deschamps A. and Richard-Forget F. (2012)**. Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Food Control* 23 (2): 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.008>.
 79. **De Oliveira B.C., Fiorda-Mello F., De Melo Pereira G.V., Thomaz-Soccol V., Rakshit S.K., De Carvalho J.C. and Soccol C.R. (2019)**. *In vitro* probiotic properties and DNA protection activity of yeast and lactic acid bacteria isolated from a honey-based kefir beverage. *Foods* 8: 485- 495. [doi:10.3390/foods8100485](https://doi.org/10.3390/foods8100485).
 80. **Dellaglio F., Roissart H., Torriani S., Curk M.C. and Janssens D. (1994)**. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*. Ed. Roissart H. et Luquet F.M. Paris. Lavoisier. Pp: 25-116.
 81. **Del Mar Jimenez-Gasco M. and Jimenez-Diaz R.M. (2003)**. Development of a specific polymerase chain reaction based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6, *Phytopathology* 93 (2): 200-209. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.200>
 82. **Del Palacio H.A., Gutierrez A. and Gutierrez E. (1985)**. Ulcera corneal por *Fusarium solani*. *Revista Iberoamericana de Micología* 2: 29–35.
 83. **Del Papa M.F. and Perego M. (2011)**. *Enterococcus faecalis* virulence regulator FsrA binding to target promoters. *J Bacteriol.* 193(7):1527-1532. [doi: 10.1128/JB.01522-10](https://doi.org/10.1128/JB.01522-10).
 84. **Demirbas F., Ispirli H., Ays A., Kurnaz E., Yilmaz M.T. and Dertli E. (2017)**. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT Food Science and Technology* 79: 361-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.067>.
 85. **Dendouga W. (2006)**. Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de Magistère. Université Mentouri. Constantine. Algérie.
 86. **Desjardins A.E. (2003)**. *Gibberella* from A (*venaceae*) to Z (*eae*). *Annual Review of Phytopathology* 41: 177-198. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.011703.115501>.
 87. **Dickson J.G., Johann H. et Wineland G. (1921)**. Second progress report on the *Fusarium* blight (scab) of wheat. *Phytopathology* 11, 35.
 88. **Diguta C.F. (2010)**. Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne. France. 193p.
 89. **Djaaboub S. (2010)**. Application du système HACCP dans la minoterie d'ELARDJA sise à Béchar. Prévention et contrôle des mycotoxines. Mémoire de magister. Université de Béchar.

- Algérie. 177p.
90. **Djossou O. (2011)**. Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A. Thèse de Doctorat. Université Paul Cezanne. Aix Marseille. France. 153p.
 91. **Doberski J.W. (1981)**. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of invertebrate pathology* 37 (2) :195-200. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90075-6).
 92. **Doghri I. (2015)**. Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin. Mise en évidence de biomolécules anti-biofilm. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle. France. 265p.
 93. **Dommergues Y. et Mangenot F. (1972)**. Ecologie Microbienne du Sol. Ed. Masson & Cie. Paris. France.
 94. **Doré T., Le Bail M., et Verger P. (2002)**. Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. *Cahiers Agricultures* 11(3) : 177-185.
 95. **Duran J.A., Malvar A., Pereiro M. and Pereiro M. (1989)**. *Fusarium moniliforme keratitis*. *Acta ophthalmologica* 67(6): 710-713. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1989.tb04406.x>.
 96. **Edwards S.G. (2004)**. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contaminations of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters* 153 (1): 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.022>.
 97. **Essid I., Medina M. and Hassouna M. (2009)**. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat science* 81(1): 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.020>.
 98. **Facklam R. and Elliott J.A. (1995)**. Identification, classification and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 8 (4): 479-495. [doi: 10.1128/CMR.8.4.479](https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.479).
 99. **Fakhrunnisa-Hashmi M.H. and Ghaffar A. (2006)**. *In vitro* interaction of *Fusarium spp* with other fungi. Karachi. *Pakistan Journal of Botany* 38(4): 1317-1322.
 100. **Fargues J. (1972)**. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* say, par *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. [*Fungi imperfecti*]. *Entomophaga* 17 : 319-337. <https://doi.org/10.1007/BF02371185>.
 101. **Favaro L., Basaglia M., Hue S.C.I., Dousset X., Gombossy de Melo Franco B.D., and Todorov S.D. (2014)**. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from homemade white brine cheese. *Food Microbiology* 38: 228-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.008>
 102. **Favaro L., Penna A.L.B. and Todorov S.D. (2015)**. Bacteriocinogenic LAB from cheeses- Application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology* 41 (1) : 37-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>
 103. **Fisher K. and Phillips C., (2009)**. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155: 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>.
 104. **Florianowicz T. (2001)**. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Technology* 212: 282-286. <https://doi.org/10.1007/s002170000261>

105. **Foroud N.A. and Eudes F. (2009).** Trichothecenes in Cereal Grains. *Int. J. Mol. Sci.* 10 (1): 147-173. <https://doi.org/10.3390/ijms10010147>
106. **Forsyth D.M., Yoshizawa T., and Morooka N. Tuite J. (1977).** Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Applied and Environmental Microbiology* 34 (5): 547-552. <https://aem.asm.org/content/aem/34/5/547.full.pdf>.
107. **Fox E.M. and Howlett B.J. (2008).** Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 11 (6): 481-487. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007>.
108. **Francl L.J. (1998).** Development of *Fusarium* head blight in relation to environment and inoculum. in: National *Fusarium* Head Blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and Disease Management, Michigan State University. USA. pp 1-3.
109. **Franco T.S., Garcia S., Hirooka E.Y., Ono Y.S. and Dos Santos J.S. (2011).** Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 111 (3): 739-748. [doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05074.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05074.x) a 2011.
110. **Franz C.M., Du toit M., Olasupo N.A., Schillinger U. and Holzapfel W.H. (1998).** Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 ready-to-eat salad. *Lett. Appl. Microbiol.* 26(3) : 231-235.
111. **Friend D.W., Trenholm H.L., Fiser P.S., Thomson B.K. and Hartin K.E. (1983).** Effect on dam performance and fetal development of deoxynivalenol (vomitoxin) contaminated wheat in the diet of pregnant gilts. *Can. J. Anim. Sci.* 63: 689-698.
112. **Friend D.W., Thomson B.K., Trenholm H.L., Hartin K.E. and Prelusky D.B. (1986a).** Effect of feeding deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat diets to pregnant and lactating gilts on their progeny. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 229-236.
113. **Friend D.W., Trenholm H.L., Thomson B.K., Fiser P.S. and Hartin K.E. (1986b).** Effect of feeding diets containing deoxynivalenol (vomitoxin) - contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 765-775.
114. **Friend D.W., Trenholm H.L., Thomson B.K., Prelusky D.B. and Hartin K.E. (1986c).** Effect on deoxynivalenol (DON)-contaminated diet fed to growing-finishing pigs on their performance at market weight, nitrogen retention and DON excretion. *Can. J. Anim. Sci.* 66 : 1075-1085.
115. **Gacem M.A. (2011).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et anti-mycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Mémoire de Magistère. Université Kasdi Merbah. Ouargla. Algérie.
116. **Gacem M.A., Ould el hadj khelil A. et Gacemi B (2011).** Etude de la qualite 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 (2): 67-76.
117. **Gajbhiye M., Prakash D., Jagdale S., Ahiwale S., Patil N. and Kapadnis B. (2012).** Pomegranate borne fungicidal lactic acid bacteria and their biodiversity. *Proceedings of National Academy of Sciences, India, Section B Biological Sciences* 82: 413-419.

- [doi:10.1007/s40011-012-0055-8](https://doi.org/10.1007/s40011-012-0055-8).
118. **Gajbhiye M. and Kapadnis B. (2017)**. Bio-efficiency of Antifungal Lactic Acid Bacterial Isolates for Pomegranate Fruit Rot Management. *Proceedings of National Academy of Sciences, India, Section B Biological Sciences* 88:1477-1488. [doi 10.1007/s40011-017-0891-7](https://doi.org/10.1007/s40011-017-0891-7).
119. **Gari-Toussaint M., Leguay J.M., Zur C., Michiels J.F., Ferraeen L., Negre S. et Le Fichoux Y. (1997)**. Keratite à *Fusarium solani* chez une patiente diabétique. *J. Mycol. Med.* 7 (4) : 227- 231.
120. **Gastelum-Martinez E. (2012)**. Interaction entre *Fusarium langsethiae* et *Geotrichum candidum* pour la réduction de la concentration de la toxine T-2 dans le procédé de brasserie. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France. 170p.
121. **Gerbardo G.A., Barberis C., Pascual L., Dalcero A., and L. Barberis (2012)**. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiol Lett* 332 (1): 27-33. [doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02570.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02570.x).
122. **Gerez C.L., Carbajo M.S., Rollan G., Torres G.L. and Font De Valdez G. (2010)**. Inhibition of *citrus* fungal pathogens by using lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 75 (6): 354-359. [doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01671.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01671.x).
123. **Gerez C.L., Torres M.J., Font de Valdez G. and Rollán G. (2013)**. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control* 64 (3): 231-237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>.
124. **Gerlach W. and Nirenberg H. (1982)**. The genus *Fusarium* - A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Berlin - Dahlem)*. 406p.
125. **Gilbert J. and Tekauz A. (2000)**. Review: recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian J. Plant Pathology* 22 (1) : 1-8. <https://doi.org/10.1080/07060660009501155>.
126. **Godon, B et Loisel W. (1997)**. Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. 2^e Ed. Tech & Doc, Paris. France. 819p.
127. **Gordon, W.L. (1952)**. The occurrence of *Fusarium* species in Canada. II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in cereal seed. *Canadian Journal of Botany* 30 (2). <https://doi.org/10.1139/b52-018>.
128. **Gourama H. (1997)**. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebensm-Wiss u-Technol* 30 : 279-283. [doi:10.1006/ftsl.1996.0183](https://doi.org/10.1006/ftsl.1996.0183).
129. **Guarro J. and Gene J. (1992)**. *Fusarium* infections, Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses* 35 (5-6): 109-114. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1992.tb00830.x>.
130. **Guarro J., Gene J. and Stchigel A.M. (1999)**. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (3): 454-500. [doi : 10.1128/CMR.12.3.45](https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.45).
131. **Guessas B. (2007)**. Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. Algérie.150p
132. **Guillo N. (1958)**. Elaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif contre *Candida albicans*. *Annales de l'institut Pasteur* 95 :194-207.

133. **Guimarães A., Santiago A., Teixeira J.A., Venâncio A. and L. Abrunhosa (2018a).** Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* 264: 31-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.025>.
134. **Guimarães A., Venancio A., and Abrunhosa L. (2018b).** Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food additives & Contaminants : Part A*. 35 (9) : 1-16. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500718>.
135. **Guiraud (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire. Ed. Dunod Paris. France. 652 p.
136. **Guo J., Mauch A., Galle S., Murphy P., Arendt E.K. and Coffey A. (2011).** Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiology* 111(2): 474-483. [doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05032.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05032.x).
137. **Gupta R. and Srivastava S. (2014).** Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology* 42: 1-7. [doi:10.1016/j.fm.2014.02.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.005).
138. **Hadrys H., Balick M. and Schierwater B. (1992).** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Molecular ecology* 1(1): 55-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00155.x>.
139. **Hall R.A. and Papierok B. (1982).** Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology* 84, 205-40. [doi : 10.1017/S0031182000053658](https://doi.org/10.1017/S0031182000053658).
140. **Hamilton R.M., Trenholm H.R., Thompson B.K. and Greenhalgh R. (1985).** The tolerance of white Leghorn and broiler chicks and turkey poults to diets contained deoxynivalenol (vomitoxin) contaminated wheat. *Poult. Sci.* 64 (2) :273 – 286. <https://doi.org/10.3382/ps.0640273>.
141. **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., (2009).** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre : 37-55.
142. **Haris C. (1989).** Introduction to modern microbiology. Black wall scientific publication. 179p.
143. **Harrigan W.F. and McCance M.E. (1976).** Eds., Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. *Academic Press*. Orlando
144. **Hassaïne O., Zadi-Karam H. and Karam N.E. (2007).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Afr. J. Biotechnol.* 6 (14): 1720-1727.
145. **Hassan Y.I. and Bullerman L.B. (2008).** Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology* 121 (1): 112-115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.038>.
146. **Hatsch D. (2004).** Interaction hôte/pathogène : étude du modèle *Humulus lupulus* / *Fusarium graminearum*. Identification, génomique et transcriptomique du pathogène. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur de Strasbourg 1. France. 183p.
147. **Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. et El Mahjoub M. (2005).** Effet

- inhibiteur *in Vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* *F. sp. adicislycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9(3) : 163-171.
148. **Hmouni A., Hajlaoui M.R. et Mlaiki A. (1996)**. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26 (3-4): 697-705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1996.tb01513.x>.
149. **Hooker D.C. Schaafsma A.W. and Tamburic-Ilincic L. (2002)**. Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant disease.* 86 (6): 611-619. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.611>.
150. **Horberg H.M. (2002)**. Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* et *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 73-80. <https://doi.org/10.1023/A:1013936624884>.
151. **Horn B.W. and Wicklow D.T. (1983)**. Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in com by *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1087-1091.
152. **Hornok L. (2007)**. Sexual and vegetative compatibility/incompatibility in *Fusarium* Species. *Acta Phytopathol. et Entomol. Hung.* 42 (2): 291-296. <https://doi.org/10.1556/aphyt.42.2007.2.11>.
153. **Hsu M.C., Chen K.W., Lo H.J., Chen Y.C., Liao M.H., Lin Y.H. and Li S.Y. (2003)**. Species identification of medically important fungi by use of real-time Light Cycler PCR, *Journal of Medical Microbiology* 52 (12): 1071-1076. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05302-0>.
154. **Huggins A.M. and Sandine W.E. (1984)**. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. *J. Dairy. Sci.* 67 (8):1674-1679. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81491-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81491-5)
155. **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. and Karam N.E. (2009)**. Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites* 60(2):177-183. [doi: 10.3989/gya.085408](https://doi.org/10.3989/gya.085408).
156. **Iftikhar-Khan A and Sarwar-Alam S. (2001)**. Detection of antifungal compounds from antagonistic microorganisms inhibiting the growth of *Fusarium oxysporum* *F. sp. ceckeris*. *Pak. J. Bot.*: 659-662.
157. **Imathiu S.M., Edwards S.G., Ray R.V. and Back M. (2014)**. Artificial inoculum and inoculation techniques commonly used in the investigation of *Fusarium* Head Blight in cereals. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 49 (2): 129-139. [doi: 10.1556/APhyt.49.2014.2.1](https://doi.org/10.1556/APhyt.49.2014.2.1).
158. **Iseppi R., Stefani S., De Niederhausern S., Bondi M., Sabia C. and Messi P. (2019)**. Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Properties of two Bacteriocin-Producing *Enterococcus mundtii* Isolated from Fresh Fish and Seafood. *Current Microbiology* 76: 1010-1019. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01716-6>.
159. **Jackson L.S. and Bullerman L.B. (1999)**. Effect of Processing on *Fusarium* Mycotoxins. *Impact of Processing on Food Safety* : 243-261. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4853-9_16
160. **James A. and Zikankuba V.L. (2018)**. Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in Sub-Sahara. *Africa Food Control* 90: 372-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.018>.

161. **Jennings P., Coates M.E., Turner J.A., Chandler E.A. and Nicholson P. (2004).** Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathol.* 53 (2): 182-190. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.00985.x>
162. **Jett B., Huycke M. and Gilmore M. (1994).** Virulence of *Enterococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 7(4): 462-478. [doi: 10.1128/CMR.7.4.462](https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.462).
163. **Jeunot B. (2005).** Les fusariotoxines sur céréales : détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré - Nancy 1. France. 135p.
164. **Joffe A.Z. (1974).** Toxicity of *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* and its relation to alimentary toxic aleukia. In: Purchase, I.F.H. (Ed.), *Mycotoxins*. Elsevier, Amsterdam: 229-262.
165. **Joffin J.N. and Leyral G. (1996).** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux. France, pp : 219-223.
166. **Juodeikienea G., Bartkiene E., Cernauskasa D., Cizeikienea D., Zadeikea D., Leleb V. and Bartkevics V. (2018).** Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT - Food Science and Technology* 89: 307-314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.061>.
167. **Kaktcham P.M., Zambou Ngoufack F., Foko Kouam E.M., Oana C., Florentina M., Calina P.C. and Florentina I-R. (2018).** Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Peanuts, Gari, and Orange Fruit Juice against Food Aflatoxigenic Molds, *Food Biotechnology* 32(4): 237-256. [doi: 10.1080/08905436.2018.1519443](https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1519443).
168. **Kamiya A., Kikuchi A., Tomita Y. and Kanbe T. (2004).** PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *Journal of Dermatological Science* 34 (1): 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.10.007>.
169. **Rayes A.A.H. (2013).** Removal of aflatoxin B1 from experimentally contaminated whole milk using a pool of probiotic strains of lactic acid bacteria and baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *New York Science Journal* 6(8): 84-90.
170. **Kempler G.M. and McKay L.L. (1980).** Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis subsp diacetylactis*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 39 (4) : 926-927.
171. **Kermiche M. (2013).** Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. Mémoire de Magister. Université de Constantine 1. Algérie.
172. **Khachatourians G.G. (1986).** Production and use of biological pest agents. *Trends in Biotechnol.* 4 (5): 120-124. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(86\)90144-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(86)90144-7).
173. **Khalef A., Zidane C., Charef A., Gharbi A., Tadjerouna M., Betbeder A.M. and Creppy E.E. (1993).** Human ochratoxicosis in Algeria. In Creppy E.E. Castegnaro M. Dirheimer G. (eds.): *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*. INSERM/John Libbey Eurotext, Montrouge and France. Pp: 123-127.
174. **Khan N.I., Schisler D.A., Boehm M.J., Lipps P.E. and Slininger P.J. (2004).** Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zea*. *Biological Control* 29 (2): 245-255. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00157-9).

175. **Khera K.S., Whalen C., Angers G., Vesonder R.F., Kuipergoodman T. (1982).** Embryotoxicity of 4- deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 487-491. <https://doi.org/10.1007/BF01605616>.
176. **Kihal M., Prevost H., Lhotte M.E., Huang D.Q. and Divibs C. (1996).** Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Letters in Applied Microbiology* 22 (3): 219-223. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01147.x>.
177. **Knasmuller S., Bresgen N., Kassie F., Mersch-Sundermann V., Gelderblom W., Zohrer E. and Eckl P.M. (1997).** Genotoxic effects of three Fusarium mycotoxins, fumonisin B1, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutat. Res.* 391(1-2): 39-48. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00030-X).
178. **Korn U., Muller T., Ulrich A. and Herta-Muller M.E. (2011).** Impact of aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates on yield parameters and mycotoxins production in wheat. *Mycotox. Res.* 27: 195-206. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0096-5>.
179. **Kwak M.K., Liu R., Kim M.K., Moon D., Kim A.H., Song S.H. and Kang A.O. (2014).** Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *Journal of Microbiology* 52: 64-70. <doi:10.1007/s12275-014-3520-7>.
180. **Lan, W., Chen Y., Wu H. and Yanagida F. (2012).** Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. *Folia Microbiologica* 57: 90-105. <doi:10.1007/s12223-012-0101-1>.
181. **Langseth W., Hoie R. and Gullord M. (1995).** The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination of Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agric. Scand.* 45 (1): 63-67. <https://doi.org/10.1080/09064719509410935>.
182. **Laref N. and Guessas B. (2013).** Antifungal activity of newly of lactic acid bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 13: 80-88. <http://www.bioaliment.ugal.ro/ejournal.htm>.
183. **Larpent J.P. (1990).** Moississures Utiles et Nuisibles : Importance Industrielle. 2^e Ed. Masson. Paris. France. 512 pages.
184. **Larpent J.P. et Larpent-Gourgaut M. (1990).** Mémento technique de Microbiologie. Tech & Doc. Lavoisier. France. 1038p.
185. **Larpent-Gourgaut M., Michaux O., Larpent J.P., Desmasures N., Desmazeaud M., Mangin I., Masson F., Montel M.C. et Tailliez P. (1997).** Les ferments lactiques et bactéries apparentées in : Microbiologie alimentaire. 1^{ère} Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. France.
186. **Lauren D.R. and Smith W.A. (2001).** Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, déoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Additives and Contaminants* 18 (11): 1011-1016. <https://doi.org/10.1080/02652030110052283>.
187. **Lee J., Lee T., Lee Y.W., Yun S.H., and Turgeon B.G. (2003).** Shirting limgal reproductive mode by manipulation of *mating type* genes: Obligatory heterothallism of *Gibberella zae*. *Molecular Microbiology* 50 (1):145-152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03694.x>.
188. **Lefort F. (2010).** Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour

- des méthodes de lutte modernes. *Hepia*. 57p.
189. **Le Plat J. (2012)**. Développement saprotrophe de *Fusarium graminearum* : rôle respectif de différents habitats naturels du champignon dans le processus d'infection du blé en bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque de fusariose. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne. France. 306p.
190. **Leroy F. et De Vuyst L. (2004)**. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre. Food Sci. Technol.* 15 (2): 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.
191. **Leslie J.F. and Summerell B.A. (2006)**. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA. 387p.
192. **Leveau J.Y., Brielle, De Roissart H., (1991)**. La flore lactique. In : Technique d'analyse et de control dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J.Y. Tec & DOC Lavoisier. Pp : 152-186.
193. **Lewis J.A. and Papavizas G.C. (1987)**. Application of Trichoderma and Gliocladium in alginate pellets for controls of Rhizoctonia solani damping-off. *Plant Pathol.* 36 (4): 438-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1987.tb02260.x>.
194. **Li S., Marquardt R.R. and Abramson D. (2000)**. Immunochemical detection of molds : A review. *Journal of Food Protection* 63 (2): 281-291. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.2.281>.
195. **Li H., Liu L., Zhang S., Cui W. and Lv J. (2012)**. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology* 65: 156-161. [doi:10.1007/s00284-012-0135-2](https://doi.org/10.1007/s00284-012-0135-2).
196. **Li H., Zhang S., Lu J., Liu L., Uluko H., Pang X. and Lv J. (2014)**. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control* 43: 57-64. [doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.045](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.045).
197. **Link H.F. (1809)**. Observaciones in ordines *plantarum* naturals, Dissetatio 1. *Mag. Ges. Naturf. Freunde. Berlin* 3: 3-42.
198. **Liorens A., Mateo R., Hinojo M.J., Logrieco A. and Jimenez M. (2004)**. Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 27 (2): 253-260. <https://doi.org/10.1078/072320204322881871>.
199. **Looijesteijn P.J., Trapel L., De Vries E., Abee T. and Hugenholtz J. (2001)**. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 64 (1-2) : 71-80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00437-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00437-2).
200. **Louzon M. et Rioux S. (2007)**. Bulletin technique de fusariose de l'épi chez le blé et l'orge. CEROM bulletin technique 2 (1) : 1-5.
201. **Luchese R.H. and Harrigan F. (1990)**. Growth of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and different initial pH values. *Journal of applied bacteriology* 69 (4): 512-519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-672.1990.tb01543.x>.
202. **Luz C., Saladino F., Luciano F.B., Manes J. and Meca G. (2017)**. *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus*

- parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT-Food Science and Technology* 81: 128-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.053>.
203. **Lynch D.R., Kawchuk L.M. Chen Q. and Kokko M. (2003)**. Resistance to *Fusarium sambucinum* in Wild and Cultivated *Solanum* Species. *American Journal of Potato Research* 80 (6): 353-358. <https://doi.org/10.1007/BF02854246>.
204. **Mackay R. and Loughnane J.B. (1945)**. Observations on *Gibberella saubineti* (Mont.) Sacc. on cereals in Ireland in 1943 and 1944. *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society* 24 (2): 9-18.
205. **Magnusson J. and Schnürer J. (2001)**. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 1-5.
206. **Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., and Schnürer J. (2003)**. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219 (1): 129-135. [doi: 10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7).
207. **Malachova A., Stockova L., Wakker A., Varga E., Krska R. and Michlmayr H. (2015)**. Critical evaluation of indirect methods for the determination of deoxynivalenol and its conjugated forms in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 6009-6020. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8793-0>.
208. **Malihipour A., Gilbert J., Piercey-Normore M. and Cloutier S. (2012)**. Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns, and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight in wheat. *Plant Disease* 96 (7): 1016-1025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0866-RE>.
209. **Marín S., Albareda X., Ramos A.J. and Sanchis V. (2001)**. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81 (11): 1060-1086. <https://doi.org/10.1002/jsfa.894>
210. **Marroki A and Bousmaha-Marroki L. (2014)**. *Lactobacilli* isolated from Algerien goat's milk as adjunct culture in dairy product. *Braz. Arch. B. Techol.* 57 (3):410-420. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000003>.
211. **Martí-Quijal F.J., Príncipe A., Tornos A., Luz C., Meca G., Tedeschi P., Ruiz M.J., Barba F.J. and Mañes J. (2020)**. Isolation, identification and investigation of fermentative bacteria from sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Evaluation of antifungal activity of fermented fish meat and by products broths. *Foods* 9 (5): 576 <https://doi.org/10.3390/foods9050576>.
212. **Martin R. (2004)**. Les fusarioses chez les céréales dans le canada atlantique. Santé de l'environnement. Centre de recherche sur les cultures et les bestiaux.
213. **Matuo T. and Snyder W.C. (1972)**. Taxonomic studies of phytopathogenic fungi in Japan. *Review of Plant Protection Research* 5(8): 3445.
214. **Mauch A., Dal Bello F., Coffey A., and Arendt E.K. (2010)**. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International Journal of Food Microbiology* 141 (1-2): 116-121. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.002](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.002).
215. **Mayeux J.V., Sandine W.E., Elliker P.R. (1962)**. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science* 45: 655.

216. **McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A. and Alexander N.J. (2011).** Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* 3 (7): 802-814. [doi:10.3390/toxins3070802](https://doi.org/10.3390/toxins3070802).
217. **McGee D.C. (1992).** Soybean diseases: a reference source for seed technologists. Ed. American Phytopathological Society. USA. 151p.
218. **Mc Mullen M., Jones R. and Gallenberg D. (1997).** Scab of wheat and barley: A Re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81(12): 1340-1348. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1340>.
219. **Mellon J.E., Cotty P.J. and Dowd M.K. (2007).** *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 497-504. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1201-8>
220. **Merabti R., Madec M.N., Chuat V., Becila F.Z., Boussekine R., Bekhouche F. and Valence F. (2019).** First insight into the technological features of Lactic Acid Bacteria isolated from Algerian fermented wheat Lemzeiet. *Current Microbiology* 76: 1095-1104. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01727-3>.
221. **Mercedes M.D.A. (2012).** *Fusarium* species infecting soybean roots: Frequency, aggressiveness, yield impact and interaction with the soybean cyst nematode. Graduate Theses and Dissertations Graduate College. Iowa State University. 162p.
222. **Merhej J. (2010).** Mécanismes moléculaires contrôlant la biosynthèse de mycotoxines par le champignon micromycète *Fusarium graminearum*. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1. France. 378p.
223. **Merhej J., Boutigny A.L., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F. and Barreau C. (2010).** Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit Contam: Part A*. 27 (5): 710-717. <https://doi.org/10.1080/19440040903514531>.
224. **Merhej J., Richard-Forget F. and Barreau C. (2011).** The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*. 48 (3): 275-284. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.008>.
225. **Messiaen C.M. and Cassini R. (1968).** Recherches sur la fusariose. IV. La systématique des *Fusarium*. *Annals Epiphyt*. 19: 387-454.
226. **Miller J.D., Taylor A. and Greenhalgh R. (1983).** Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology* 29 (9) : 83-179. <https://doi.org/10.1139/m>
227. **Miller S.S., Chabot D.M.P., Ouellet T., Harris L.J. and Fedak G. (2004).** Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology* 26 (4): 453-463. <https://doi.org/10.1080/07060660409507165>.
228. **Mislivec P.B., Trucksess M.W. and Stoloff L. (1988).** Effect of other toxigenic mold species on Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture. *Journal of Food Protection* 51 (6): 449-451. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-51.6.449>.
229. **Missaoui J., Saidane D., Mzoughi R. and Minervini F. (2019).** Fermented Seeds “Zgougou” from Aleppo Pine as a Novel Source of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* 7 (12): 709. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120709>.

230. **Moëller V. (1955)**. Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 36: 158-172.
231. **Mohran M.A., Megalla S.E.I. and Said M.R. (1984)**. Effect of aflatoxin B-1 on the proteolytic activity of some lactic-acid bacteria. *Mycopathologia* 86: 99-101.
232. **Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G. (2008)**. Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. Pp : 512-592.
233. **Morooka N., Uratsuji N., Yoshizawa T. and Yamamoto H. (1972)**. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Jpn J. Food Hyg.* 13: 368-375.
234. **Morrissey R.E. and Vesonder R.F. (1985)**. Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague-Dawley rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(5): 1062-1066. <https://aem.asm.org/content/aem/49/5/1062.full.pdf>.
235. **Morrissey R.E., Norred W.P., Hinton D.M., Cole R.J. and Dorner J.W. (1987)**. Combined effects of the mycotoxins Aflatoxin-B1 and Cyclopiazonic Acid on sprague-dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 25 (11): 837-842. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(87\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(87)90262-6).
236. **Muhialdin B.J., Hassan Z. and Sadon S.K. (2011)**. Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004 and *L. paracasi* D5 on selected foods. *Journal of Food Science* 76 (7): 493-499. [doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x).
237. **Muhialdin B.J., Hassan Z., Baker F.A., Alghoory H.L. and Saari N. (2015)**. Novel antifungal peptides produced by *Leuconostoc mesenteroides* DU15 effectively inhibit growth of *Aspergillus niger*. *Journal of Food Science* 80 (5): 1026-1030. [doi:10.1111/1750-3841.12844](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12844).
238. **Muhialdin B.J., Hassan Z., Abu Bakar F. and Saari N. (2016)**. Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control* 59 : 27-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.022>.
239. **Multon J.L. (1982)**. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. Vol I. 579p.
240. **Munoz R., Arena M.E., Silva J. and Gonzalez S.N. (2010)**. Inhibition of mycotoxin –producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (4): 1019-1026. [doi:10.1590/S1517-83822010000400021](https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400021).
241. **Nascimento L.C.S., Casarotti S.N., Todorov S.D. and Penna A.L.B. (2019)**. Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Annals of Microbiology* 69: 241–252. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1412-5>.
242. **Nash S.N. and Snyder W.C. (1962)**. Quantitative estimations by counts of propagules of bean rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology* 73(2): 458-462.
243. **Naveena B.M., Mendiratta S.K. and Anjaneyulu A.S.R. (2004)**. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus* Roxb (Kachri) and *Zingiber officinale* roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science* 68 (3): 363-369. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.004>.

244. **Ndagano D., Lamoureux T., Dort C., Vandermoten S. and Thonart P. (2011).** Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *Journal of Food Science* 76 (6): 305-311. [doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x).
245. **Nelson P.E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O. (1983).** *Fusarium species*. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pa. USA. 193pp.
246. **Nelson P.E. (1991).** History of *Fusarium* systematic. *The American Phytopathological Society* 81 (9): 1045-1048.
247. **Nelson P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D. and Desjardins A.E. (1991).** Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (8): 2410-2412.
248. **Nelson P.E., Juba J.H., Ross P.F. and Rice L.G. (1994).** Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. *J. AOAC Int.* 77 (2): 522-525. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.522>.
249. **Ngang J.J.E., Yadang G., Kamdem S.L.S., Kouebou C.P., Fanche S.A.Y., Kougan D.L. and Etoa F.X. (2014).** Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Science and Technology* 25 (3): 245-259. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.969195>.
250. **Ngang J.J.E., Yadang G., Kamdem S.L.S., Kouebou C.P., Fanche S.A.Y., Kougan D.L.T., Tsoungui A. and Etoa F.X. (2015).** Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Science and Technology* 25 (3): 245-259. [doi: 10.1080/09583157.2014.969195](https://doi.org/10.1080/09583157.2014.969195).
251. **Niderkorn V., Boudra H. and Morgavi D.P. (2006).** Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* 101(4): 849-856. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x>.
252. **Niderkorn V., Morgavi D.P., Aboab B., Lemaire M. and Boudra H. (2008).** Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 106: 977-985. [doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04065.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04065.x)
253. **O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K. and Casper H.H. (2000).** Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (14):7905-7910. <https://doi.org/10.1073/pnas.130193297>.
254. **O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Corby Kistler H. and Aoki T. (2004).** Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology.* 41(6): 600-623. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.03.003>.
255. **O'Donnell K., Ward T.J., Aberra D., Kistler H.C., Aoki T., Orwig N., Kimura M., Bjørnstad A. and Klemsdal S.S. (2008).** Multilocus genotyping and molecular phylogenetics

- resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* 45 (11): 1514-1522. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.09.002>.
256. **Oliveira P.M., Brosnan B., Furey A., Coffey A., Zannini E. and Arendt E.K. (2015).** Lactic acid bacteria bio-protection applied to the malting process. Part I: Strain characterization and identification of antifungal compounds. *Food Control* 51: 433-443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.004>
257. **Oliveira P.M, Brosnan B., Jacob F., Furey A., Coffey A., Zannini E. and Arendt E.K. (2015).** Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. *Food Control* 51: 433-443. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.004>.
258. **Olympia M., Fukuda H., Ono H., Kaneko Y. and Takano M. (1995).** Characterization of starch-hydrolysing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, ‘BurongIsda’ and its amylolytic enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80 (2):124-130. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)93206-Y](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)93206-Y).
259. **Orlando B., Grignon G., Vitry C., Kashefifard K. and Valade R. (2019).** *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Research* 35: 369-380. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00363-x>.
260. **Osborne L.E. and Stein J.M (2007).** Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119 (1-2): 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032>.
261. **Ouadghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P., Naser S., Gevers D., Lefebvre K., Swings J. and Amar M. (2009).** Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk ‘Iben’. *Journal of Applied Microbiology* 106 (2) : 486-495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04016.x>
262. **Ouiddir M., Bettache G., Salas M.L., Pawtowski A., Donot C., Brahimi S., Mabrouk K., Coton E. and Mounier J. (2019).** Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiology* 82:160-170 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>.
263. **Ouyang Y.L., Li S., and Pestka J.J. (1996).** Effects of vomitoxin (Deoxynivalenol) on transcription factor NF- κ B/Rel binding activity in murine EL-4 thymoma and primary CD4+ T cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140 (2): 328-336. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0228>.
264. **Papavizas GC. (1985).** *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>.
265. **Park D.L. (2002).** Effect of Processing on Aflatoxin. In: DeVries J.W., Trucksess M.W., Jackson L.S. (eds) *Mycotoxins and Food Safety. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 504: 173-179. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0629-4_17.
266. **Parry D.W., Jenkinson P. and McLeod L. (1995).** *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology* 44 (2): 207-238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x>.
267. **Paulitz T.C., Ahmad J.S. and Baker R. (1990).** Integration of *Pythium nunn* and

- Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Plant Soil* 121:243-250.
268. **Pereyra S.A., Dill-Macky R. and Sims A.L. (2004).** Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease* 88 (7): 724-730. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.724>.
269. **Pestka J.J. and Smolinski A.T. (2005).** Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8(1): 39-69. <https://doi.org/10.1080/10937400590889458>.
270. **Peyer L.C., Axel C., Lynch K. M., Zannini E., Jacob F. and Arendt E.K. (2016).** Inhibition of *Fusarium culmorum* by carboxylic acids released from lactic acid bacteria in a barley malt substrate. *Food Control* 69: 227-236. [doi:10.1016/j.foodcont.2016.05.010](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.010).
271. **Pfohl-Leszkowicz A. (2001).** Définition et origines des mycotoxines in Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Ed. Tec & Doc, Lavoisier. Pp : 3-14.
272. **Phalip V., Monneta C., Schmitt P., Renault P., Godonb J.J. and Divib C. (1994).** Purification and properties of the α -acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 2118. *FEBS Letters.* 351: 95-99.
273. **Picard K. (2000).** Lutte biologique par *Pythium oligandrum* en cultures hors-sol : dynamique des populations, antagonisme et rôle d'une protéine dans l'induction de résistance chez la tomate. Thèse de doctorat. Université de Brest. France. 162p.
274. **Pinton P. (2007).** Etude des effets d'une mycotoxine, le deoxynivalenol, sur les cellules épithéliales intestinales. Mémoire du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. France. 34p.
275. **Pinton P., Tsybulskyy D., Laffitte J., Callu P., Lucioli J., Lyazhri F., Grosjean F., Bracarense A.P., Kolf Clauw M., et Oswald I.P. (2012).** L'intestin, une cible pour le déoxynivalénol et ses dérivés. *Journées Recherche Porcine* 44 : 85-90.
276. **Piotrowska M. et Zakowska Z. (2005).** The limitation of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology* 54 (4): 279-286.
277. **Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeney P.L.H. and Parente E. (2008).** Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study. *Int Dairy J.* 18 (1):81-92. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.002>.
278. **Pirgozliev S.R., Edwards S.G., Hare M.C. and Jenkinson P. (2003).** Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 731-742. <https://doi.org/10.1023/A:1026034509247>.
279. **Pitcher D.G., Saunders N.A. and Slown R.J. (1989).** Ravid extraction of bacterial genomic DNA with *Guanidium thiocyanate*. *Letters in Applied Microbiology* 8: 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>.
280. **Pitt J.I. and Christian J.H.B. (1968).** Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Applied Microbiology* 16 : 1853-1858
281. **Pitt J.I. and Hocking A.D. (2009).** Fungi and food spoilage. 3rd Ed. Springer. 524p.
282. **Ponts N. (2005).** Influence de Stress Oxydatifs sur la Biosynthèse de Mycotoxines de *Fusarium spp.* Contaminantes de l'Epi de Maïs. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1.

- France. 416P.
283. **Prathivadi-Bayankaram P. and Sellamuthu P.S. (2016).** Antifungal and anti-aflatoxigenic effect of probiotics against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Toxin Reviews* 35(1-2) : 10-15. [doi:10.1080/15569543.2016.1178147](https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1178147).
284. **Prelusky D.B., Yeung J.M., Thomson B.K. and Trenholm H.L. (1992).** Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22 : 36-40. <https://doi.org/10.1007/BF00213300>.
285. **Prelusky D.B. and Trenholm H.L. (1993).** The efficacy of various classes of antiemetics in preventing deoxynivalenol-induced vomiting in swine. *Natural Toxins* 1 (5): 296-302. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010508>.
286. **Prema P., Smila D., Palavesam A. and Immanuel G. (2010).** Production and characterization of an antifungal compound (3-Phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology* 3: 379-386. [doi:10.1007/s11947-008-0127-1](https://doi.org/10.1007/s11947-008-0127-1).
287. **Pritsch K., Raidl S., Marksteiner E., Blaschke H., Agerer R., Schloter M. and Hartmann A. (2004).** A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods* 58 (2): 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.001>.
288. **Privat K. et Thonart P. (2010).** Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2) : 339-348.
289. **Pugh G.W., Johann H. and Dickson J.G. (1933).** Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural research.* 46: 771-97.
290. **Raillo A. (1950).** Fungi of the genus *Fusarium* Pub. State Agr. Lit, Moscow, USSR. 415p.
291. **Ramirez M.L., Reynoso M.M., Farnochi M.C. and Chulze S. (2006).** Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 139-148. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0009-1>.
292. **Ramoska W.A. (1984).** The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the ching bug, *Blissus leucopterus*. *Journal Invertebral Pathology* 43 : 89-394.
293. **Rasic J.R., Skrinjar M. and Markov S. (1991).** Decrease of aflatoxin B in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia* 113 (2): 117-119. [doi: 10.1007/bf00442421](https://doi.org/10.1007/bf00442421).
294. **Rather I.A., Seo B.J., Rejish Kumar V.J., Choi U.H., Choi K.H., Lim J.H. and Park Y.H. (2013).** Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Letters in Applied Microbiology* 57: 69-76. [doi:10.1111/lam.12077](https://doi.org/10.1111/lam.12077).
295. **Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M. and Loubière P. (2003).** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* sub sp. *Lactis biovardiacety lactis* in response to autoacidification and temperature down shift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016- 8023. [doi: 10.1128/AEM.71.12.8016-8023.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8016-8023.2005).

296. **Reboux G. (2006).** Mycotoxines : effet sur la santé et interaction avec d'autres composants organique. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 46 :208-212. <https://doi.org/10.1016/j.allerg.2006.01.036>.
297. **Rehaïem A., Ben Belgacem Z., Edalatian M.R., Martínez B., Rodríguez A., Manai M. and Guerra N.P. (2014).** Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control* 37: 343-350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.044>.
298. **Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2008).** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International J. Food Microbiology*. 122 (1-2): 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.057>.
299. **Riba A., Bouras N., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2010).** *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (10): 2772-2777. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.005>.
300. **Riba G., Marcandier S. et Goussard J. (1984).** Influence de l'humidité relative sur l'agressivité et la viabilité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, hyphomycètes pathogènes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübn. *Agronomie. EDP Sciences*. 4 (2) :189-194. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00884626/document>.
301. **Ricciardi A. and Clementi F. (2000).** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications, *Italian Journal of Food Science* 12 (1): 23-45.
302. **Rioux S. (2015).** Fongicides homologués pour la lutte à la fusariose de l'épi des céréales. Québec.
303. **Rizzello C.G., Cassone A., Coda R. and Gobbetti M. (2011).** Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry* 127 (3): 952-959. <doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.063>.
304. **Robbana-Barnat S., Lafarge-Frayssinet C. and Frayssinet C. (1989).** Use of cell cultures for predicting the biological effects of mycotoxins. *Cell Biology and Toxicology* 5(2): 217-226. <https://doi.org/10.1007/BF00122655>.
305. **Rogers C.G. and Heroux-Metcalf C. (1983).** Cytotoxicity and absence of mutagenic activity of vomitoxin (4-deoxynivalenol) in a hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. *Cancer Lett.* 20 (1): 29-35. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(83\)90183-0](https://doi.org/10.1016/0304-3835(83)90183-0).
306. **Rojo F., Ferez M., reynoso M., Torres A. and Chulze S. (2007).** Effect of *Trichoderma* species on growth of *Fusarium proliferatum* and production of fumonisins, fusaproliferin and beauvericin. *Mycotoxin Research* 23 : 173-179. <https://doi.org/10.1007/BF02946044>.
307. **Roquebert M.F (1998).** Taxonomie des moisissures : Méthodes de culture et techniques d'observation et d'identification. in *Moisissures des aliments peu hydratés*. Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Pp: 39-95.
308. **Roméo Y., Bouvier J. et Gutierrez C. (2001).** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (mini-revue). *Lait* 81 : 49-55.
309. **Rotter B.A., Prelusky D.B. and Pestka J.J. (1996).** Toxicology of deoxynivalenol

- (vomitoxin), *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 (1): 1-34. <https://doi.org/10.1080/009841096161447>.
310. **Rouse S., Harnett D., Vaughan A. and van Sinderen D. (2007)**. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104: 915-923. [doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03619.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03619.x)
311. **Ruas-Madiedo P. and De los Reyes-Gavilán CG. (2005)**. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88(3): 843-56. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8).
312. **Russo P., Arena M. P., Fiocco D., Capozzi V., Drider D. and Spano G. (2016)**. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology* 247:48-54. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027).
313. **Ryan L.A.M., Zannini E., Dal Bello F., Pawlowska A., Koehler P. and Arendt E.K. (2011)**. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology* 146 (3): 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036>
314. **Ryu D., Jackson L.S. and Bullerman L.B. (2002)**. Effects of Processing on Zearalenone. In: DeVries J.W., Trucksess M.W., Jackson L.S. (eds) *Mycotoxins and Food Safety. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504. Springer, Boston, MA. Pp: 205-216. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0629-4_21
315. **Ryu E.H., Yang E.J., Woo E.R. and Chang H.C. (2014)**. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology* 41: 19-26. [doi:10.1016/j.fm.2014.01.011](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.011)
316. **Saint-Cyr M. (2013)**. Impact des Mycotoxines sur le Microbiote Intestinal Humain, cas particulier du Déoxynivalénol. Thèse de doctorat. Université de Rennes 1. France. 167p.
317. **Salomskiene J., Jonkuvienė D., Macioniene I., Abraitiene A., Zeime J., Repeckiene J. and Vaiciulyte Funk L. (2019)**. Differences in the occurrence and efficiency of antimicrobial compounds produced by lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology* 245:569-579. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-03227-3>
318. **Sarkar A., Das R.C., Rashid M.D.H., Ali M., Islam M.S., Asaeda T. and Wang Q. (2015)**. Biocontrol potentiality of Isolated *Trichoderma spp.* against *Pestalotzia theae* Saw. in Tea. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 50 (2): 179-186. <https://doi.org/10.1556/038.50.2015.2.3>.
319. **Saladino F., Luz C., Manyes L., Fernandez-Franzon M. and Meca G. (2016)**. *In vitro* antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* 67: 273-277. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.012>.
320. **Sarver B.A.J., Ward-Todd J., Gale-Liane R., Broz K., Corby-Kistler H., Takayuki A., Nicholson P., Carter J. and O'Donnell K. (2011)**. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology* 48 (12): 1096-1107. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.09.002>.
321. **Sathe S.J., Nawani N.N., Dhakephalkar P.K. and Kapadnis B.P. (2007)**. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal*

- of Applied Microbiology. 103(6): 2622-2628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>
322. **Savoy De Giori G. and Hébert M. (2001).** Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology 14: Food Microbiol. protocols*. Humana Press. Totowa: 197-202.
323. **Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic L., Miller J.D. and Hooker D.C. (2001).** Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23 (3): 279-285. <https://doi.org/10.1080/07060660109506941>.
324. **Schachermayr G. and Fried P.M. (2000).** Problemerkreis Fusarien und ihre Mykotoxine (La fusariose de l'épi des céréales en Suisse). Eidgenössische Forschungsanstalt für (FAL), CH 8046 Zürich. Pflanzen, AGRAR Forschung 7 (6): 252-257.
325. **Schatzmayr G. and Streit E. (2013).** Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: Facts and figures. *World Mycotoxin Journal*. 6 (3): 213-222. <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1572>.
326. **Schillinger U. and Villarreal J.V. (2010).** Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* 21: 107-111. [doi:10.1016/j.foodcont.2008.11.010](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.010).
327. **Schnurer J. and Magnusson J. (2005).** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16 : 70-78. [doi:10.1016/j.tifs.2004.02.014](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014)
328. **Scott P.M. (1996).** Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: Introduction. *Food additives and contaminants* 13(Suppl.): 19-21.
329. **Scorz L.B., Astolfi P., Reartes D.S., Schmale D.G., Moraes M.G. and Del Ponte E.M. (2009).** Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* 58 (2): 344-351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01949.x>.
330. **Sempere F. and Santamarina M.P. (2016).** Microscopic and macroscopic study of the interaction between *Alternaria alternata* (Fr) Keissler and *Nigrospora oryzae* (Berk. Et Broom) Petch. *Annals of Microbiology* 56 (2): 101-107.
331. **Sempere F. and Santamarina M.P. (2010).** Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternata* (fr.) Keissler. *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (3). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010005000003>.
332. **Sevgi E. and Tsveteslava I.I. (2015).** Antifungal activity of Lactic acid bacteria, isolated from bulgarian wheat and rye flour. *Journal of Life Sciences* 9: 1-6. [doi: 10.17265/1934-7391/2015.01.001](https://doi.org/10.17265/1934-7391/2015.01.001)
333. **Shang L., Bai X., Chen C., Liu L., Li M., Xia X. and Wang Y. (2019).** Isolation and identification of a *Bacillus megaterium* strain with ochratoxin A removal ability and antifungal activity. *Food Control* 106: 106743. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106743>.
334. **Sharma S.K. and Dohroo N.P. (1991).** Post-harvest management of rhizome rot (*Fusarium oxysporum f.sp. zingiberi* Trujillo) of ginger through chemical and antagonist. *Indian Cocoa Arecanut and Spices Journal* 14: 150-152.
335. **Sharma S. (2012).** Antagonistic interaction between *Fusarium Oxysporum var. cumini*

- and *Aspergillus niger*. *Journal of research in Biology* 1: 032-034.
336. **Shehata M.G., Badr A.N., El Sohaimy S.A., Asker D. and Awad T.S. (2019).** Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid *bacterium* and their potential application as food bio-preservatives. *Annals of Agricultural Sciences* 64 (1): 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2019.05.002>.
337. **Shephard G.S., Westhuizen L.V.D., Gatyeni P.M., Katerere D.R. and Marasas W.F.O. (2005).** Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *J. Agric. Food. Chem.* 53 (23): 9293-9296. <https://doi.org/10.1021/jf052101s>.
338. **Simpson D.R., Weston G.E., Turner J.A., Jennings P. and Nicholson P. (2001).** Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* 107: 421-431. <https://doi.org/10.1023/A:1011225817707>.
339. **Siou D. (2013).** Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien. Thèse de doctorat. Université Paris-sud 11.france. 197p. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00849969/document>.
340. **Sjogren J., Magnusson J., Broberg A., Schnurer J. and Kenne L. (2003).** Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology* 96(12): 7554-7557. [doi: 10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003)
341. **Smaoui S., Elleuch L., Bejar W., Karray-Rebai I., Ayadi I., Jaouadi B., Mathieu f., Chouayekh H., Bejar S. and Mellouli, L. (2010).** Inhibition of fungi and Gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 1132-1146. [doi:10.1007/s12010-009-8821-7](https://doi.org/10.1007/s12010-009-8821-7).
342. **Smith W.G. (1884).** Diseases of Field and Garden Crops. Macmillan and Co. London, pp: 208-213.
343. **Snyder W.C. and Hansen H.N. (1940).** The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27 (2): 64-67. <https://doi.org/10.2307/2436688>.
344. **Stathers T.E., Moore D. and Prior C. (1993).** The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *Journal of Invertebrate Pathology* 62(2): 111-115. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1085>.
345. **Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Toth B., Varga J. and O'Donnell K. (2007).** Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* 44 (11): 1191-1204. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.03.001>
346. **Stiles M.E. and Holzappel W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36 (1): 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0).
347. **Strange R.N. and Smith H. (1971).** A fungal growth stimulant in anthers, which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology* 1 (2): 141-50. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(71\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0048-4059(71)90023-3)
348. **Strom K., Sjogren J., Broberg A. and Schnurer J. (2002).** *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9): 4322-4327. [doi: 10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002)

349. **Suproniene S., Semaskiene R., Juodeikiene G., Mankeviciene A., Cizeikiene D., Vidmantiene D., Basinskiene L. and Sakalauskas S. (2015).** Seed treatment with lactic acid bacteria against seed-borne pathogens of spring wheat. *Biocontrol Science and Technology* 25(2): 144-154. [doi:10.1080/09583157.2014.964661](https://doi.org/10.1080/09583157.2014.964661).
350. **Sutton J.C. (1982).** Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4 (2): 195-209. <https://doi.org/10.1080/07060668209501326>.
351. **Symons S.J., Clear R.M., Bell K. and Butler C. (2002).** Identifying wheat and barley seed affected by *Fusarium* head blight. *Grain Biology Bulletin* 2.
352. **Tabuc C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. INPT. Toulouse. France. 190p.
353. **Tan M.K. and Niessen L.M. (2003).** Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycol. Res.* 107 (7): 811-821. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008013>.
354. **Thapa N., Pal J. and Tamang J.P. (2006).** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 107 (1): 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.009>.
355. **Thiel P.G., Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Sheperd G.S., Gelderblom W.C.A. and Niewenhuis J.J. (1991).** Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl Environ. Microbiol.* 57: 1089-1093.
356. **Thivierge N. (1999).** Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* pour le développement de ferments mésophiles à aptitudes fromagères élevées (Cheddar). Mémoire de maîtrise. Université de Laval. Canada. 85p.
357. **Thomas P.A. and Geraldine P. (1992).** Fungal keratitis due *Fusarium* and other fungi. *J. Mycol. Med.* 2: 121-131.
358. **Tivoli B. (1988).** Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement. *Agronomie, EDP Sciences.* 8 (3) : 211-222. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885091/document>.
359. **Tozlovanu M. (2008).** Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Thèse de doctorat. Ecole doctorale Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries. Toulouse. France. 261p.
360. **Trail F., Xu H., Loranger R. and Gadoury D. (2002).** Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* 94 (2): 181-189. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833223>.
361. **Trenholm H.L., Prelusky D.B., Young J.C. and Miller J.D. (1988).** Reducing mycotoxins in animal feeds, Agriculture Canada Publ. 1827E, Agriculture Canada, Ottawa.
362. **Trucksess M.W., Nesheim S. and Eppley R.M. (1984)** Thin Layer Chromatographic determination of Deoxynivalenol in Wheat and Corn. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (1):40-43. <https://doi.org/10.1093/jaoac/67.1.40>.
363. **Turkington T.K., Petran A., Yonow T. and Kriticos D.J. (2016).** *Fusarium*

- graminearum*. HarvestChoice Pest Geography. St. Paul, MN: InSTePP□Harvest Choice. 8p.
364. **Ueno Y. (1985)**. The toxicology of mycotoxins. *Crit rev toxicol.* 14(2): 99-132.
365. **Ueno Y. (1984)**. *Trichothecenes: chemical, biological, and toxicological aspects*. Kodansha. 336p.
366. **Usha E., Reddy S.A., Manuel S.G.A. and Kale R.D.(2012)**. *In vitro* control of *Fusarium oxysporum* by *Aspergillus sp.* and *Trichoderma sp.* isolated from vermicompost. *J.Bio.Innov.* 1(5):142-147.
367. **Vamanu A., Vamanu E., Drugulescu M., Popa O. and Campeanu G. (2005)**. Identification of a lactic *bacterium* strain used for obtaining a pollen-based probiotic product. *Turk J Biol.* 30: 75- 80.
368. **Versalovic J., Koeuth T. and Lupski R. (1991)**. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19 (24) : 6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>.
369. **Verscheure M., Lognay G. and Marlier M. (2002)**. Les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Revue bibliographique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6 (3), 131-142. <http://hdl.handle.net/2268/87446>.
370. **Vesonder R.F., Ciegler A. and Jensen A.H. (1973)**. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl. Microbiol.* 26 (6) : 1008-10010.
371. **Vignola C.L. (2002)**. Science et Technologie du Lait : Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique. Canada. 600p.
372. **Vuillemard J.C. (1986)**. Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 :1-65.
373. **Waché Y. (2009)**. Toxicologie du déoxynivalenol chez le porc : effets sur la réponse immunitaire, la flore intestinale et la sensibilité aux pathogènes. Thèse de doctorat. INPT. Toulouse. France. 190p.
374. **Wang H.K., Yan H., Shin J., Huang L., Zhang H.P. and Qi W. (2011)**. Activity against plant pathogenic fungi of *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 isolated from Xinjiang koumiss in China. *Annals of Microbiology* 61: 879-885. [doi:10.1007/s13213-011-0209-6](https://doi.org/10.1007/s13213-011-0209-6).
375. **Wang H.K., Yan Y.H., Wang J.M., Zhang H.P. and Qi W. (2012)**. Production and characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE* 7(1) : e29452. [doi:10.1371/journal.pone.0029452](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029452).
376. **Ward T.J., Clear R.M., Rooney A.P., O'Donnell K., Gaba D., Patrick S., Starkey D.E., Gilbert J., Geiser D.M and Nowicki T.W. (2007)**. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium* *graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology.* 45 (4): 473-484. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.003>.
377. **Waters C.M., Antiporta M.H., Murray B.E. and Dunny G.M. (2003)**. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, 181 supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 185 (12):3613-3623. [doi: 10.1128/JB.185.12.3613-3623.2003](https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3613-3623.2003).
378. **Wheeler K.A., Hurdman B.F. and Pitt J.I. (1991)**. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 22 (2-3): 141-149. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90063-U](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90063-U).

379. **Widestrand J. and Pettersson H. (2001)**. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. *Food Additives & Contaminants* 18 (11) : 987-992. <https://doi.org/10.1080/02652030110050168>.
380. **Widstrom N.W. (1992)**. Aflatoxin in developing maize: interaction among involved biota and pertinent economic factors. *Handbook of Appl. Mycology: mycotoxins in ecological systems* 5: 23-58.
381. **Wiseman D.W. and Marth E.H. (1981)**. Growth and aflatoxin production by *A. Parasiticus* when in the presence of *Streptococcus. lactis*. *Mycopathologia*, 73: 49-56. <https://doi.org/10.1007/BF00443014>.
382. **Wollenweber H.W. and Reiking O.A. (1935)**. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey. Berlin 335p.
383. **Xu X.M. and Nicholson P. (2009)**. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>.
384. **Yang E.J. and Chang H.C. (2010)**. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* 139 (1-2): 56-63. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.012](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.012).
385. **Yates I.E., Hiett K.L., Kapczynski D., Smart W., Glenn A.E., Hinton D.M., Bacon C.W., Meinersmann R., Liu S. and Jaworski A.J. (1999)**. GUS transformation of the maize fungal endophyte *Fusarium moniliforme*. *Mycologia Research* 103 (2): 129-136. <https://doi.org/10.1017/S0953756298006911>.
386. **Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C. and O'Donnell K. (2009)**. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*. 101 (6): 841-852. <https://doi.org/10.3852/08-217>.
387. **Yun S.H., Arie T., Kaneko I., Yoder O.C. and Turgeon B.G. (2000)**. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* 31 (1): 7-20. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1226>.
388. **Zhang J.B., Li H.P., Dang F.J., Qu B., Xu Y.B., Zhao C.S. and Liao Y.C. (2007)**. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research* 111(8): 967-975. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.008>.
389. **Zebboudj N., Yezli W., Hamini-Kadar N. and Kihal M. (2020)**. Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium* species responsible for tomato crown and root rots. *Environmental and Experimental Biology* 18: 7-13. <http://doi.org/10.22364/eeb.18.02>.
390. **Živković S.T., Stošić S.S., Ristić D.T., Vučurović I.B. and Stevanović M. (2019)**. Antagonistic potential of *Lactobacillus plantarum* against some postharvest pathogenic fungi. *Matica Srpska J. Nat. Sci. Novi Sad.* 136: 79-88. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1936079Z>.
391. **Zourari A., Accolas J.P. and Desmazeaud M.J. (1992)**. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72 (1): 1-34. <https://doi.org/10.1051/lait:199211>.

392. **Zummo N. and Scott G.E. (1992).** Interaction of *Fusarium monilliforme* and *Aspergillus flavus* on kenel infection and aflatoxin contamination in maize ears. *Plant disease*. 76 (8) : 771-773.

Annexes

ANNEXE I-Introduction

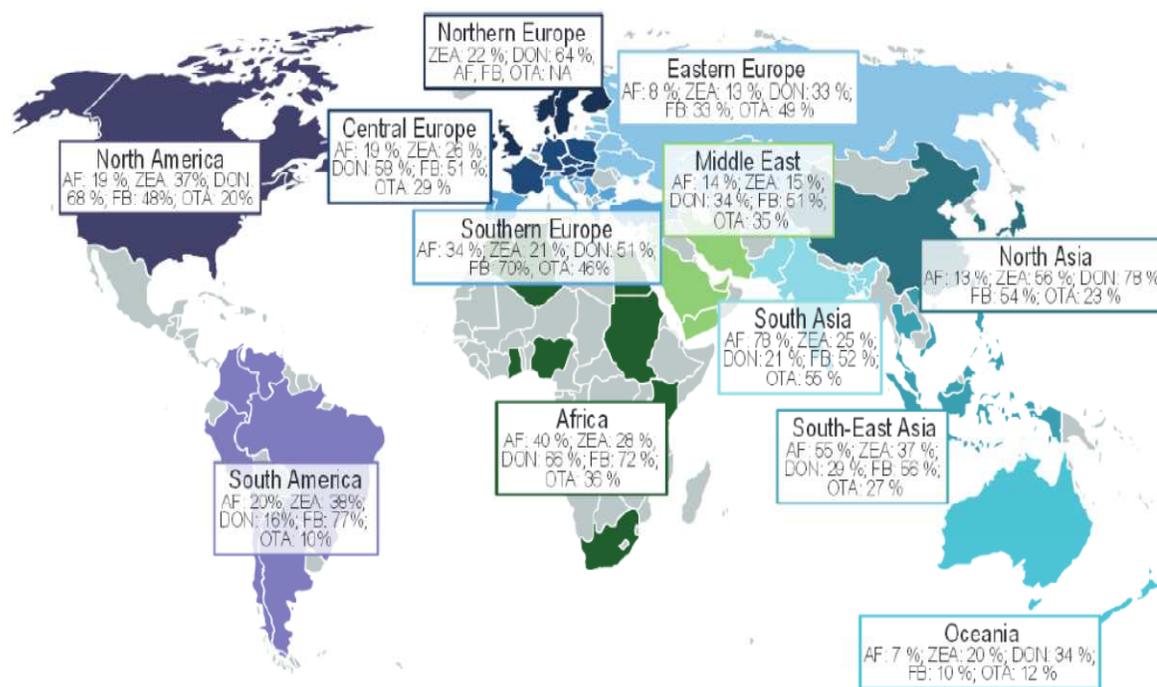


Figure 1 : Prévalence des mycotoxines dans le monde entre 2005 et 2012. Données issues de 19 000 échantillons analysés (céréales et produits transformés destinés à l'alimentation animale). AF : aflatoxines, ZEA : zéaralénone, DON : déoxynivalénol, FB : fumonisines, OTA : ochratoxine A. (Schatzmayr *et al.*, 2013).

ANNEXE II-Chapitre II

Milieux de culture pour 1000ml d'eau distillée

PDA		MEA	
Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200g	Matière sèche	50g
Sucrose	10g	Agar	5g
Agar	15g		
G25N		CYA	
KH ₂ PO ₄	0.75 g	Czapek Concentre	10 ml
Czapek Concentre	7.5 ml	KH ₂ PO	41 g
Extrait de levure	3.7 g	Extrait de levure	5 g
Glycerol	250 g	Sucrose	30 g
Agar	12 g	Agar	15 g
SNA		Milieu AFPA	
K ₂ HPO ₄	0.5g	Extrait de levure	20g
KNO ₃	1g	peptone	10g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g	Citrate ferrique ammoniacal	0.5g
KCL	0.5g	chloramphenicol	0.1g
Glucose	0.2g	Dichloran solution ethanolique à 0.2%	1ml
Agar	20g	Agar	15g

DCPA			DCMA	
Peptone bactériologique	15 g	Extrait de malt	10g	
K ₂ HPO ₄	1 g	Dichloran solution éthanoïque	1ml	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	Agar	15g	
Chloramphénicol	0,2 g			GYEP
Dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution alcoolique (0,2 g de dichlorandans 100 ml d'éthanol)	1 ml	Glucose	50g	
Crystal violet en solution aqueuse (50 mg de crystal violet dans 100 ml d'eaudistillée)	1 ml	Extrait de levure	1g	
Agar	15 g	Néopeptone:	1g	
MRS			BHI	
Peptone	10g	Peptone de caséine	15g	
Extrait de viande	10g	Peptone de viande	6g	
Extrait de levure	5g	Infusion cervelle cœur	6g	
Sodium acétate	10g	Extrait de levure	5g	
Di-potassium hydrogénophosphate	2g	Dextrose	2g	
Polysorbate 80	1g	Chlorure de sodium	5,5g	
Ammonium citrate	2g	Phosphate dipotassique	2,5g	
Magnésiumsulfate	0,10g			KMK
Manganèsesulfate	0,05g	Biopolytone	3g	
Glucose	20g	Glucose	2,5g	
Tween 80	1 ml	Agar	15g	
Agar	15g			
Citrate de Simmons			Mannitol-mobilité	
Sulfate de magnésium	0,2 g	Peptone	20g	
Phosphate de mono-ammoniaque	1g	Nitrate de potassium	1g	
Phosphate bipotassique	1g	Mannitol	2g	
Citrate de sodium	2g	Rouge de phénol	40g	
Chlorure de sodium	5g	Agar	4g	
Bleu de bromothymol	0,08g			
Agar	15g			
M17			Bouillon à l'esculine	
Extrait de levure	2,5g	Peptone	10g	
Extrait de viande	5g	Esculine	1g	
Tryptone	5g	Citrate de fer ammoniacal	1g	
Peptone papainique	2,5g			
Peptone pepsique de viande	5g			Möller à l'arginine
Acide ascorbique	0,5g	Extrait de levure	3g	
Lactose	5g	l-arginine	5g	
Glycérophosphate de sodium	19g	Glucose	1g	
Sulfate de magnésium	0,25g	Chlorure de sodium	5g	
Agar	15g	Indicateur de pH le pourpe de bromocrésol	0.16mg	

	MSE		CATC	
Tryptone		10g	Peptone de caseine	18g
Gélatine		2,5g	Extrait de levure	5g
Extrait de levure		5g	Potassium	5g
Saccharose		100g	Citrate de sodium	15g
Glucose		5g	Tween 80	1ml
Citrate de sodium		1g	Agar	15g
Azides de sodium		75mg		
Agar		15g	Solutions ajoutées	
	Gélose blanche à 2%		TTC	0.1g
Agar		20g	Carbonate de sodium	2g
			Azide de sodium	0.4g
	Milieu Clark et Lubs		Lait de Sherman	
Peptone		7g	Lait écrémé	10 g
Phosphate dipotassique		5g	Extrait de levure	0.5 g
Glucose		5g	Eau distillée	950 ml
	YMA		Gélose à la gélatine	
Peptone		5g	Peptone	5g
Extrait de levure		3g	Extrait de levure	3g
Lait écrémé		1g	Gélatine	30g
Agar		15g	Eau distillée qsp	1000ml
			Agar	15g
	Gélose hypersaccharosée		API50 CHL	
Extrait de viande		10g	Polypeptone :	10g
Extrait de levure		3g	Extrait de levure :	5g
Peptone		2.5g	Tween 80	1ml
Saccharose		150g	Phosphate dipotassique	2g
K ₂ HPO ₄		2g	Acétate de sodium :	5g
NaCl		1g	Citrate diammonique :	2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O		0.2g	Sulfate de magnésium :	0,20g
Agar		15g	Bromocrésol Pourpre	0,17g
			Sulfate de manganèse	0,05g
	Révélateurs chimiques pour 100ml			
Ninhydrine: révélateur des amines, acides aminés et les osamines			Chlorure de fer ferreux (FeCl₃): réactif des phénols	
Ninhydrine :		0.2g	Mélanger 1% du FeCl ₃ dans un mélange de	
Acétone :		100ml	méthanol/eau (50/50 v/v).	
	Révélateur de Molish : réactif des sucres		Dichromate de potassium : révélateurs des lipides	
α-naphtol		0,25 g	Dichromate de potassium	10,5mg
Ethanol		50 mL	Acide sulfurique	6,5ml
Acide sulfurique à 20%		50 mL	Ethanol	40,5ml
			Eau distillée	4ml

ANNEXES III –Chapitre III



Figure 2 : Témoins de *F. graminearum*. (A) Techniques 1, 2 et 3 ; (B, C) Technique 4.

ANNEXES IV –Discussion générale

Tableau 1 : Les différents critères de la qualité du blé tendre et du blé dur à l'échelle nationale (**Journal officiel de la république algérienne, décret n°88-152 du 26 juillet 1988**)

Elément	Teneur maximale autorisée	
	Blé dur	Blé tendre
Poids spécifique	76-80 Kg/hectolitre	74-77 Kg/hectolitre
Taux d'humidité	≤17%	≤17%
Impureté de I ^{ère} catégorie dont : grains nuisibles	1-3% 0.25%	1-3% 0.25%
Impuretés II ^{ème} catégorie dont :	1-10%	1-6%
Grains boutés	5%	-
Grains cassés	5%	4%
Grains punaisés	≤10%	2%
Grains métadinés	10-20%	-
Présence de grains de blé tendre	5%	-
Présence d'ergot	1‰	1‰

Tableau 2 : les différents critères de la qualité du blé tendre et du blé dur à l'échelle mondiale (**Codex STAN 199-1995**)

Elément	Définition	Teneur maximale autorisée
Teneur en eau	-	14.5% m/m
Sclerotium du champignon <i>Claviceps purpurea</i>	-	0.05% m/m
Graines crotalaires, nielles de blé, stamaines et autres variétés de graines généralement reconnues comme dangereuses pour la santé	-	0% m/m ou teneur n'ayant pas d'impact sur la santé
Métaux lourds	-	0% m/m ou teneur n'ayant pas d'impact sur la santé
Résidus de pesticides	-	0% m/m ou teneur n'ayant pas d'impact sur la santé
Souillures	Impuretés d'origines animales y compris les insectes mortes	0.1% m/m
Matières étrangères organiques	Autres graines que le blé, tiges, etc.	1.5% m/m
Matières étrangères inorganiques	Pierres, poussière	0.5% m/m

Prevalence of Mycoflora and *Fusarium graminearum* Chemotype DON in Wheat in Bechar Province of South-Western Algeria

S. DJAABOUB^{1,2*}, A. MOUSSAOUI^{1,2}, B. MEDDAH^{2,3}, S. GOURI¹
and K. BENYAHIA¹

¹Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature and Life, Mohamed Tahri University,
BP 417. 08000. Bechar, Algeria

²Laboratory of the Valorization of Plant Resources and Food Security in Semi-arid Areas
of South West Algeria, Bechar, Algeria

³Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature and life, Mustapha Stambouli University,
BP 305 Road of Mamounia, 29000, Mascara, Algeria

(Received: 9 September 2019; accepted 20 November 2019)

Wheat and its derivatives are a main staple food for the Algerian populations. The objective of this study aims to analyze local and imported wheat grains for fungi particularly *Fusarium graminearum* chemotype DON and evaluate deoxynivalenol (DON) contaminated wheat collected from Bechar region, in south-western Algeria. A total of 64 of wheat samples were examined for fungal contamination and fungal load was determined by means of standard microbiological method. DON was detected using the ELISA technique. The results revealed that 98.44% of analyzed samples showed positive results regarding fungal contamination. More precisely, local wheat was dominated by *Aspergillus* and *Penicillium* and imported wheat was dominated by *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus* species. Results showed that 62.5% of *F. graminearum* strains produced DON. Contamination levels of wheat with DON ranging from <0.04 ppm to >5ppm for soft wheat and from <0.12ppm to >15ppm for durum wheat. So, 62.96% of soft wheat grains and 55.56% of durum wheat imported from France, and also 18.18% of local durum wheat exceed the permissible limit by far. This study provides basic grounds in assessing the degree of fungal and potential DON contamination in Algerian wheat.

Keywords: Deoxynivalenol (DON), *Fusarium graminearum*, fungal load, wheat, Bechar district (Algeria).

Moulds play a significant role in wheat grains spoilage worldwide causing important economic losses and lowering their quality (Pitt and Hocking, 2009; Saladino et al., 2016; Luz et al., 2017; Kaktcham et al., 2018; Guimarães et al., 2018a). Moreover, their secondary metabolites are highly toxic chemical products. These compounds cause carcinogenic, mutagenic, teratogenic, neurotoxic, nephrotoxic, immunosuppressive and es-trogenic diseases (Bennett and Klich, 2003; Pawlowska et al., 2012; Guimarães et al., 2018b). Thus, they are considered as sources of severe health risk for humans and animals.

Fusarium graminearum Schwab (teleomorph *Gibberella zeae*) (Kim et al., 2003) is the primary phyto-agent of *Fusarium* head blight (FHB) or scab of small grain cereals

*Corresponding author; e-mail: gouri_serra@yahoo.fr

around the world (Hornok, 2007; Yli-Mattila et al, 2009). Indeed, several researchers have revealed that *F. graminearum* is the most prevalent species in North America (USA and Canada), Australia, central southern Europe and China (Chen et al., 1982; Burgess et al., 1987; Gilbert and Tekauz, 2000; Tan and Niessen, 2003). In France, *F. graminearum* is the most common species associated with FHB on wheat and durum wheat causing serious losses in crop revenues, bad quality of grains and toxins contamination such as deoxynivalenol, nivalenol and fumonisin (Chehri et al., 2011; Korn et al., 2011; Orlando et al., 2019). Moreover, this devastating agent can be found in fields and persists during the long years of storage (Zhang et al., 2007). Deoxynivalenol or vomitoxin belongs to trichothecenes type B (Malachova et al., 2015; Chilaka et al., 2018; James and Zikankuba, 2018) which can cause several toxic effects including infertility and reproductive problems, mutagenic and carcinogenic (Nelson et al., 1991; Thiel et al., 1991; Shephard et al., 2005), diarrhoea, vomiting, leukopenia, haemorrhage and shock (Foroud and Eudes, 2009).

In Algeria, wheat is the most widespread staple crop which is consumed in the form of couscous, pasta, macaroni, spaghetti, bread, and *frik* is a cultural tradition (Riba et al., 2010). In spite of the production of more than a million and a half hectares of wheat on average since 1961, grain yields stay below the demand of the national market. Consequently, Algeria remains dependent on the importation of wheat grains. However, massive importation and long-term storage promote fungal contamination, with damage ranging from the loss of quality and sanitation of the grain (Djaaboub et al., 2018). Although many studies about aflatoxigenic and ochratoxigenic contamination were carried out (Khalef et al., 1993; Riba et al., 2008, 2010), there is no data either on the frequency of *Fusarium graminearum* chemotype DON or about levels of DON in wheat grains. The aim of the present study was to assess the safety of wheat consumed in Algeria, especially in Bechar province with respect to fungal species particularly *Fusarium graminearum* chemotype DON, and DON contamination.

Materials and Methods

Sampling

Local and imported wheat grains were collected from Bechar area, southwestern Algeria (31°37'00" north, 2°13'00" south), from the local grain cooperative and dried vegetable silos and the farmers (for local durum wheat) in sterile conditions. A total of 64 samples of 1kg were brought to the laboratory to be analyzed for fungal contamination, especially for *Fusarium graminearum* chemotype deoxynivalenol (DON). The details of each sample are provided in (Table 1).

Materials

Culture medium used for fungal isolation and enumeration was Potato Dextrose Agar (PDA). Furthermore, various standard agar media have been used for the morphological and toxicological identification of fungi, Spezieller Nährstoff-farmer (SNA for microscopic identification), Czapek Yeast Extract (CYA), Dichloran Chloramphenicol Malt Extract (DCMA for *Alternaria* species), Dichloran Chloramphenicol Pepton (DCPA a se-

Table 1

Informative data on the samples of wheat

Sample	Nbr	Provenance
Imported soft wheat	27	France
Local soft wheat	6	Taghit. Bechar district. Algeria
Imported durum wheat	9	France
Local durum wheat	22	Oum Chegag. Bechar district. Algeria
Total	64	

lective medium for *Fusarium spp.*), 25% Glycerol Nitrate (G25N), Malte Extract (MEA) and Glucose Yeast Extract Pepton Broth (GYEP for screening *F. graminearum* chemotype DON). Immunoaffinity columns for cleaning DON (I clean C + DON) and quantitative ELISA kit for the detection DON (CelerDONV3) were procured from tecnalab (Italy) and DON standard from Lbios (France).

Fungal isolation and identification

For fungal isolation, a dilution method was performed. Five grams of ground grains were added to 45 ml sterile 9% physiological water (dilution 10^{-1}) and two drops of Tween 80.1ml of this dilution was diluted in 9 ml sterile 9% physiological water (dilution 10^{-2}). 200 μ l of each dilution were inoculated onto PDA medium in duplicate by the spread plate method. The plates were then incubated at 25 ± 2 °C for 7 days. The total fungal load (FL) per genus was calculated as colony forming unit per gram (CFU/g) of the sample (Aiko and Mehta, 2016), percent frequency (Fr %) and percent relative density (RD %) were also, calculated using the following formula (Nagaraja et al., 2016):

$$\text{Frequency \%} = \frac{\text{Nbr of samples infected with fungi Genus}}{\text{Nbr of samples analyzed}} \times 100$$

$$\text{Relative Density \%} = \frac{\text{Nbr of fungi species isolated by Genus}}{\text{Total Nbr fungi isolated}} \times 100$$

After that, each fungal pure culture was identified macroscopically and microscopically based on their cultural and morphological characteristics using fungi identification keys and manuals of Leslie and Summerell, 2006; Pitt and Hocking, 2009. The origin of each purified isolate was given in (Table 2).

Screening Fusarium graminearum chemotype DON

Spore suspension (10^{-4} spores/ml) of *F. graminearum* isolates were inoculated in 8 ml of GYES broth and further incubated at 25 °C for 10 days (Boutigny et al., 2009). Afterwards, 4 ml of the culture medium was removed by centrifugation and added to 8 ml of acetonitril for DON extraction. The extracts were further purified by immunoaffinity columns (I Clean C + DON) as indicated in the instructions provided by the manufacturer. DON was detected by TLC plate.20 μ l of each extract and DON standard (100 mg/ml)

Table 2

Origin of purified isolate

Sample	Fungal purified isolate
Imported soft wheat	<i>Alternaria infectoria</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. funiculosus</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>P. italicum</i> , <i>P. chrysogenum</i> ,
Local soft wheat	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Alternaria infectoria</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>P. Simplicissimum</i> , <i>P. Expansum</i> , <i>A. nidulans</i> ,
Imported durum wheat	<i>F. equiseti</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>P. fellutanum</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nidulans</i> ,
Local durum wheat	<i>A. sydowi</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. fischerianus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. italicum</i> , <i>P. paxilli</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. thomii</i> , <i>P. citreonigrum</i> , <i>P. glandicola</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. pinophilum</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Ulocladium botrytis</i> .

were spotted on the TLC plate and revealed chemically by aluminum chloride after a heating at 120 °C for 10 mn (Balzer et al., 2004). The TLC plates were visualized under ultra violet (UV) light at 365 nm and blue spots appeared.

Screening wheat grains for DON contamination

Quantitative analysis of DON from wheat grains was carried on, according to manufacturer instructions of ELISA Kit for detection of DON (Celer DON V3. Code MD 101).

Statistical analysis

Three independent experiments were performed for all assays of fungal load and mean values \pm standard deviation (SD) were calculated.

Results

Fungal contamination

In this study, fungal load in the samples was enumerated and given in (Table 3). The results show that 98.44% of analyzed samples were positive for fungal contamination. Imported soft wheat samples had the highest total fungal contamination ($4342 \times 10^2 \pm \text{cfu/g}$) which oscillated between a maximum of $1199.5 \times 10^2 \pm 89.44 \text{ cfu/g}$ (S13) and a minimum of $1 \times 10^2 \pm 1.41 \text{ cfu/g}$ (S31), followed by local soft wheat ($1066.5 \times 10^2 \text{ cfu/g}$ in the range of $315 \times 10^2 \pm 190.92 \text{ cfu/g}$ for S6 to $69.5 \times 10^2 \pm 95.46 \text{ cfu/g}$ for S1), and imported durum wheat ($672.5 \times 10^2 \text{ cfu/g}$ in the range of $583.5 \times 10^2 \pm 805.39 \text{ cfu/g}$ for S6 to $7 \times 10^2 \pm 1.41 \pm \text{cfu/g}$ for S63), and finally by local durum wheat which contains the

Table 3

Fungal load of all genuses per sample collected from different type of wheat grains

Type of Wheat	Sample	Fungal load (UFC×10 ⁷ /g)*					
		Total Flora	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
Local soft wheat	S1	69.5 ± 95.46	/**	33.5 ± 44.55	5.5 ± 7.78	/	30.5 ± 43.13
	S2	106 ± 149.91	/	51 ± 72.12	/	/	55 ± 77.78
	S3	238 ± 159.81	/	217.5 ± 159.1	5 ± 7.07	/	15.5 ± 7.78
	S4	162 ± 214.96	/	36 ± 49.50	15 ± 21.21	/	111 ± 144.25
	S5	176 ± 248.90	/	45.5 ± 64.35	20 ± 28.28	/	110.5 ± 156.27
	S6	315 ± 190.92	/	140 ± 56.57	/	/	175 ± 134.35
Total		1066.5	00	523.5	45.5	00	497.5
Imported soft wheat	S7	100% Rhizopus	/	/	/	/	/
	S8	122.5 ± 43.13	/	56.5 ± 6.36	15 ± 7.07	5 ± 7.07	46 ± 35.36
	S9	121 ± 83.44	/	70 ± 42.43	/	/	51 ± 41.01
	S10	250 ± 226.27	/	70 ± 84.85	10 ± 0.	70 ± 56.57	100 ± 84.85
	S11	171.5 ± 19.09	/	18.5 ± 3.54	55 ± 7.07	88 ± 36.77	10 ± 14.14
	S12	36 ± 9.90	/	22.5 ± 27.58	11 ± 15.56	/	2.5 ± 2.12
	S13	1199.5 ± 89.80	/	50 ± 14.14	345 ± 63.64	624.5 ± 181.72	180 ± 42.43
	S14	890 ± 134.35	/	180 ± 98.99	105 ± 28.28	280 ± 169.71	325 ± 106.06
	S15	715 ± 7.07	/	160 ± 8.48	/	305 ± 8.48	250 ± 7.07
	S16	100% Rhizopus	/	/	/	/	/
	S17	100% Rhizopus	/	/	/	/	/
	S18	3 ± 4.24	/	2.5 ± 3.54	/	/	0.5 ± 0.71
	S19	221.5 ± 16.26	1.5 ± 2.12	/	220 ± 14.14	/	/
	S20	108.5 ± 21.92	30 ± 14.14	/	25 ± 7.07	53.5 ± 0.71	/
S21	44.5 ± 7.78	20.5 ± 3.54	23.5 ± 3.54	0.5 ± 0.71	/	/	
S22	64 ± 33.94	/	5 ± 7.07	43.5 ± 19.09	5 ± 7.07	10.5 ± 14.85	
S23	229.5 ± 19.09	/	/	218 ± 33.94	10 ± 14.14	1.5 ± 0.71	
S24	37.5 ± 45.96	5 ± 7.07	2.5 ± 3.54	25 ± 35.36	/	5 ± 7.07	

Table 3 continued

Type of Wheat	Sample	Fungal load (UFC×10 ² /g)*					
		Total Flora	Alternaria spp.	Aspergillus spp.	Cladosporium spp.	Fusarium spp.	Penicillium spp.
	S25	10±14.14	/	5±7.07	5±7.07	/	/
	S26	13.5±19.09	0.5±0.71	/	/	/	13±18.38
	S27	27.5±34.65	1.5±2.12	26±36.77	/	/	/
	S28	5.5±7.78	/	5.5±7.78	/	/	/
	S29	2±1.41	1±1.41	/	/	/	1±0
	S30	11.5±16.26	0.5±0.71	/	/	1±1.41	10±14.14
	S31	1±1.41	1±1.41	/	/	/	/
	S32	35±7.07	5±7.07	5±7.07	5±7.07	/	20±0
	S33	22±1.41	5±7.07	6.5±4.95	/	10.5±13.43	/
Total		4342	71.5	709	1083	1452.5	1026

Type of Wheat	Sample	Fungal load (UFC×10 ² /g)*					
		Total Flora	Alternaria spp.	Aspergillus spp.	Cladosporium spp.	Fusarium spp.	Penicillium spp.
Local durum wheat	S34	57.5±34.65	5±7.07	5±7.07	36.5±6.36	/	11±14.14
	S35	72±15.56	10±0	10±0	25±7.07	5.5±7.78	21.5±0.71
	S36	62.5±44.55	/	11±0	35.5±36.06	/	16±8.49
	S37	26±7.07	1±0	15±7.07	/	/	10±14.14
	S38	30±14.14	5±7.07	/	/	/	25±7.07
	S39	41.5±57.98	0.5±0.07	16±23.34	/	/	25±35.36
	S40	5±7.07	/	5±7.07	/	/	/
	S41	25±21.21	/	25±21.21	/	/	/
	S42	25±21.21	/	/	/	/	25±21.21
	S43	5±7.07	/	/	/	/	5±7.07
	S44	/	/	/	/	/	/
	S45	10±14.14	/	/	/	/	10±14.14
	S46	0.5±0.71	/	/	/	/	0.5±0.71
	S47	25±35.36	/	15±21.21	/	/	10±14.14

Table 3 continued

Type of Wheat	Sample	Fungal load (UFC × 10 ⁷ /g)*						
		Total Flora	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Cladosporium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Ulocladium spp.</i>
	S48	3 ± 2.12	/	1.5 ± 2.12	0.5 ± 0.71	/	0.5 ± 0.71	0.5 ± 0.71
	S49	2 ± 1.41	/	1.5 ± 0.71	/	/	0.5 ± 0.71	/
	S50	2 ± 2.83	/	/	/	/	2 ± 2.83	/
	S51	100% Rhizopus	/	/	/	/	/	/
	S52	1 ± 1.41	1 ± 1.41	/	/	/	/	/
	S53	95 ± 134.35	50 ± 70.71	25 ± 35.36	20 ± 28.28	/	/	/
	S54	100 ± 14.14	20 ± 28.28	25 ± 35.36	25 ± 35.36	/	30 ± 42.43	/
	S55	100% Rhizopus	/	/	/	/	/	/
Total	588	92.5	155	142.5	5.5	192	0.5	00
Imported durum wheat	S56	100% Rhizopus	/	/	/	/	/	/
	S57	8.5 ± 7.78	/	2.5 ± 0.71	/	/	6 ± 7.07	/
	S58	11.5 ± 3.54	/	/	/	0.5 ± 0.71	11 ± 4.24	/
	S59	100% Rhizopus	/	/	/	/	/	/
	S60	583.5 ± 805.39	/	/	/	583.5 ± 805.39	/	/
	S61	100% Rhizopus	/	/	/	/	/	/
	S62	55 ± 21.21	/	/	/	5 ± 7.07	50 ± 28.28	/
	S63	7 ± 1.41	/	0.5 ± 0.71	/	6.5 ± 2.12	/	/
	S64	7 ± 7.07	/	/	/	/	7 ± 1.41	/
Total	672.5	00	3	00	595.5	74	00	00

*Result is given as mean value ± SD; **No contaminated sample.

least total fungal load (588×10^2 cfu/g in the range of $72 \times 10^2 \pm 15.56$ cfu/g for S35 to $0.5 \times 10^2 \pm 0.71 \pm$ cfu/g for S46).

The different genus isolated from wheat grains samples and identified were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium* and *Rhizopus*. Moreover, mycological analysis of different samples using plating technique revealed the diversity and differences in frequency and relative density of each genus identified from each type of wheat and each sample.

According to the results summarized in (Table 4), the higher percent frequency in the imported soft wheat grains was 62.96% for *Aspergillus spp.* and 59.26% for *Penicillium spp.* and the least was 40.74% for *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.* In comparison, local soft wheat samples were 100% contaminated by *Aspergillus* and *Penicillium* species and 66.67% were contaminated by *Cladosporium spp.* Higher frequency for imported durum wheat was observed by *Fusarium* and *Penicillium* genus with 44.44% and the lowest frequency was 2.22% for *Aspergillus spp.* the frequency percent for local durum wheat samples revealed that *Penicillium* genus exhibited the higher rate (68.18%), followed by *Aspergillus* genus (54.55%), *Alternaria* genus (36.36%) and *Cladosporium* genus (27.27%) and the least amounts were shown by *Fusarium* and *Ulocladium* genus (4.55%).

Table 4

Frequency and Relative density of all genuses per type of wheat grains

Fungal Genus	Type of Wheat							
	Imported Soft Wheat		Local Soft Wheat		Imported Durum Wheat		Local Durum Wheat	
	Fr %	RD %**	Fr %	RD %	Fr %	RD %	Fr %	RD %
<i>Alternaria spp.</i>	40.47	1.65	00	00	00	00	36.36	15.73
<i>Aspergillus spp.</i>	62.96	16.33	100	49.09	2.22	0.45	54.55	26.36
<i>Cladosporium spp.</i>	51.85	24.94	66.67	4.27	00	00	27.27	24.23
<i>Fusarium spp.</i>	40.70	33.45	00	00	44.44	88.55	4.55	0.94
<i>Penicillium spp.</i>	59.26	23.63	100	46.65	44.44	11	68.18	32.65
<i>Ulocladium spp.</i>	00	00	00	00	00	00	4.55	0.09

* Fr %: Percent frequency; ** RD%: percent of relative density.

On the other hand, the percent relative density was also calculated for different genus. The results obtained show that the higher relative density observed in imported soft wheat was for *Fusarium spp.* (33.45%), followed by *Penicillium spp.* (23.63%), *Aspergillus spp.* (16.33%) and *Cladosporium spp.* (10.33%) and the lowest was for *Alternaria spp.* (1.65%). On the contrary, in the case of local soft wheat, the highest relative density recorded was for *Aspergillus* and *Penicillium* species with 49.09 % and 46.65% respectively and the least value was for *Cladosporium spp.* (4.27%). In imported durum wheat, the rate of relative density observed was 88.55% for *Fusarium spp.* 11% for *Penicillium spp.* and 0.45% for *Aspergillus spp.* The higher relative density in local durum wheat was revealed for *Penicillium spp.* (32.65%), *Aspergillus spp.* (26.36%), *Cladosporium spp.* (24.23%), *Alternaria spp.* (15.73%) and the least was for *Fusarium spp.* (0.94%) and *Ulocladium spp.* (0.09%).

235 purified isolates were represented by 42 species including: *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Aspergillus clavatus*, *A. fischerianus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*,



Fig 1. Microscopic (G×100) and macroscopic aspect on MEA plate of some fungi. A. *Alternaria alternata*; B. *Aspergillus clavatus*; C. *Aspergillus flavus*; D. *Aspergillus niger*; E. *Aspergillus terreus*; F. *Cladosporium cladosporioides*; G. *Fusarium graminearum*; H. *Fusarium verticillioides*; I. *Penicillium digitatum* and J. *Ulocladium botrytis*

A. nidulans, *A. niger*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sydowi*, *A. terreus*, *A. ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. glandicola*, *P. italicum*, *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. paxilli*, *P. pinophilum*, *P. simplicissimum*, *P. thomii*, *P. variable* and *Ulocladium botrytis*. (Fig. 1) presents some identified fungal species.

Determination of F. graminearum chemotype DON

In our comparative study, we state that the imported wheat samples analyzed were highly contaminated by *Fusarium* species, especially, by *F. graminearum* with 65%. Consequently, eight of them were screened for their capacity to produce DON using TLC. Accordingly, for the TLC plate given in (Fig. 2), five on eight isolates were positive for

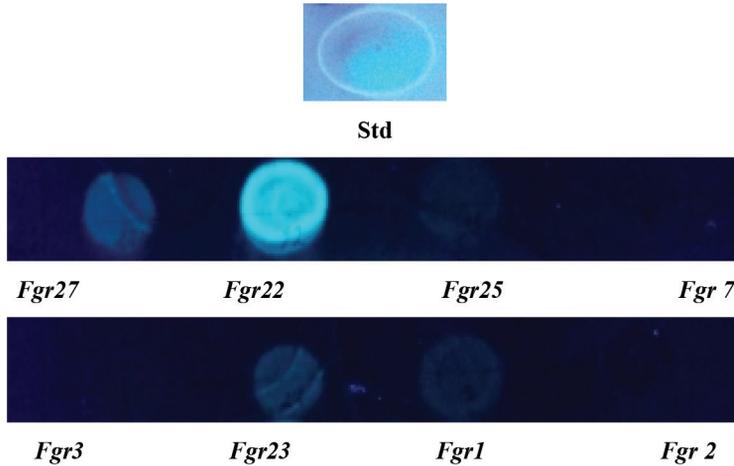


Fig. 2.

Fig 2. TLC analysis of *F. graminearum* chemotype DON. Std. standard (100 mg/ml);
Fgr. Different isolates of *F. graminearum*

the deoxynivalenol synthesis. Indeed, it clearly appears that Fgr 22 isolate produce the higher quantity of DON which exceeds 100 $\mu\text{g/ml}$ (in comparison with the control TLC plate), followed by Fgr 27, Fgr23, Fgr 25 and then Fgr1. However, the isolates Fgr2, Fgr3 and Fgr7 showed negative chemotype DON. Therefore, the screening of imported wheat grains contamination with DON was further conducted. It should be noted that local wheat grains were contaminated by one species of *Fusarium* which was *F. oxysporum*.

DON contamination

The 64 wheat samples analyzed by quantitative ELISA kit expose the difference between the quantities of DON. The results revealed that the minimum of DON quantity was inferior to 0.04 ppm (= 40 $\mu\text{g/Kg}$) and the maximum was superior to 5 ppm (=5000 $\mu\text{g/Kg}$) on soft wheat grains. Furthermore, results on durum wheat grain, the quantities of DON oscillate between 0.12 ppm and 15 ppm (Table 5). Therefore, 62.96% of soft wheat grains and 55.56% of durum wheat imported from France, far exceed the limits required. In comparison, soft and durum wheat samples inspected respect the limits of DON required by the regulation, except for samples n° 36, 37, 38 and 50 which exceed 15 ppm (18.18%).

Discussion

The purpose of this study was, on the one hand, to evaluate the safety of consumed wheat grains in Bechar, and on the other hand, to bring about the novel fungal species isolated from imported wheat and their toxin. The present study revealed that most of local and imported wheat grains samples were contaminated with the common genus of fungi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* and *Cladosporium*. Indeed, several sci-

Table 5

Quantity of deoxynivalenol (DON) in wheat grain by ELISA test

Type of Wheat	Sample		DON (ppm*)
	Nb	%	
Imported soft wheat	8	12.5	< 0.04
	1	1.56	0.852
	1	1.56	0.970
	1	1.56	1.358
	1	1.56	1.456
	1	1.56	1.498
	1	1.56	1.584
	1	1.56	1.952
	1	1.56	1.963
	1	1.56	2.102
	1	1.56	2.265
	1	1.56	2.365
	1	1.56	2.658
	1	1.56	3.596
	1	1.56	4.267
5	7.81	> 5	
Local soft wheat	3	4.69	< 0.04
	1	1.56	0.154
	1	1.56	0.698
	1	1.56	0.949
Imported durum wheat	5	7.81	< 0.12
	1	1.56	3.657
	3	4.69	> 15
Local durum wheat	11	17.19	< 0.12
	1	1.56	0.178
	1	1.56	0.356
	1	1.56	0.532
	1	1.56	0.548
	1	1.56	0.835
	1	1.56	1.320
	1	1.56	1.528
	4	6.25	> 15

* 1ppm DON = 1µg DON/g = 1000µg/Kg.

entific investigations in cereal fungal contamination were revealed around the world and demonstrated that this contamination was caused especially by the cited genus and the results obtained were in agreement with the previous findings (Ferreira-Geraldo et al., 2006; Pitt and Hocking, 2009; Chehri et al., 2010; Franco et al., 2011; Battilani et al., 2016; Nagaraja et al., 2016; Al-Haik et al., 2017; Djaaboub et al., 2018). According to Klich (2002) fungus propagules get on grain most often with dust from soil, from the surface of plant remnants. Although molds take an important role of the balance of the ecosystem due to the decomposition of plant residues and contribute to the soil fertility (Tančić Živanov et al., 2017), they play a consequential part in the spoilage of strategic food. Thus, fungal contamination is the cause of the loss of 5 to 10% of the world's food production (Pitt and Hocking, 2009; Guimaraes et al., 2018a and b). Additionally, several fungal species can synthesize the toxic metabolites which have a harmful effect on animal and human health. Deoxynivalenol is one of five agriculturally important mycotoxins ubiquitous on grains around the world which is produced by *Fusarium graminearum* strains (Miller, 2016). In this context, the European commission declared in 2003 that this species is one of the most frequently found *Fusaria* on European cereals. Moreover, in recent years, *F. graminearum* chemotype DON was dominant in European cooler wheat-growing areas (Xu et al., 2005; Van der Fels-Klerx et al., 2012). In the present study, the results of fungal investigation demonstrate the dominance and the frequency of *Fusarium* species especially of *F. graminearum* chemotype DON on imported wheat grains. It should be noted that the threshold for DON required by regulation 856/2005 JOCE June, 6, 2005 in cereals intended for human consumption is 1250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ and is 1750 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for durum wheat (Boutigny et al., 2009). Our data demonstrate that 62.5% of *F. graminearum* isolates tested produce an average of 25 to 200 mg DON/ml. Thus, all of imported samples were contaminated by DON, and 62.96% of soft wheat grains and 55.56% of durum wheat exceeded the maximum allowable limit. Obviously, this confirms results which reported high levels of DON produced in European cereals (Langseth and Rundberget, 1999; Yazar and Omurtag, 2008; Foroud and Eudes, 2009; Boutigny et al., 2009; McCormick et al., 2011). Mastanjević et al. (2018) reported that mycotoxins, such as DON, can resist high temperatures and lower pH values and they are also capable of surviving the drying temperatures during cooking. Otherwise, local wheat grains were predominated by *Aspergillus* and *Penicillium* species with 49.09% and 46.65% respectively on soft wheat and 26.36% and 32.65% respectively on durum wheat. Several studies had reported that these genera were the main contaminants of Algerian grains (Tahani et al., 2008; Riba et al., 2010; Aoues et al., 2017) particularly in subtropical and warm temperate regions such as Bechar district where it is very hot, there is low rainfall and dry conditions. The results obtained were in accordance with those reported by several researchers for cereal grains and seeds (Weidenbörner et al., 2000; Berghofer et al., 2003). Moreover, different studies had revealed the contamination of local grains with aflatoxin B1 and ochratoxin A, and hence, their concentration in the samples is of high significance (Riba et al., 2008). Other genera, such as *Alternaria*, *Cladosporium* and *Rhizopus*, were also reported as prevalent fungi in cereal and wheat (Pitt and Hocking, 2009; Riba et al., 2008 and 2010). The relative density and frequency of different genera of molds and their associated toxins depend to the geographical location, environmental factors (pH, Aw, temperature, substrate), interaction with other microorganisms (bacteria, molds, yeast), cultural and storage prac-

tices (Van der Fels-Klerx et al., 2012; Trabelsi et al., 2017; Chilaka et al., 2018; Vismara et al., 2019). Besides, mycotoxins production depended of a combination of phenotypic plasticity and genetic variation of different isolates of the same species.

In conclusion, we revealed in this study a high frequency and the dominance of *Fusarium* on imported wheat grains. In comparison, with local wheat we note the occurrence of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. Although the percentage of *F. graminearum* chemotype DON was not important, we detected high levels of DON content in French wheat grains. Thus, there is a serious and persistent problem in the processing or in the storage of wheat and its derivatives. Consequently, additional investigations on the evaluation of DON levels in imported cereal are necessary to provide more data and to evaluate the exposure of the Algerian population to DON and health risks of this toxin.

Acknowledgements

This work is part of a doctoral thesis prepared by Serra Djaaboub. We would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria for him financial support. The authors are grateful to Tedj Ghomri, translator and English professor for having proofread the manuscript.

Literature

- Aiko, V. and Mehta, A. (2016): Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 Biotech.* 6, 1–10.
- Al-Haik, W. M., Abdullah Bawazir, A. M., Aly, M. M., Al-Haddad, A. M. and Shantaram, M. (2017): Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against toxigenic fungi. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.* 5, 1–8.
- Aoues, K., Boutoumi, H. and Benrima, A. (2017): Phytosanitary status of local durum wheat stored in Algeria. *Revue Agrobiologia.* 7, 286–296.
- Balzer, A., Tardieu, D., Bailly, J. D. and Guerre, P. (2004): The trichothecenes: toxins nature, natural occurrence in food and feeds, and ways of struggle. *Revue Méd. Vét.* 155, 299–314.
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T. and Robinson, T. (2016): Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports. Nature* 6, 24328.
- Bennett, J. W. and Klich, M. (2003): Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516.
- Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D. and Jansson, E. (2003): Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 137–149.
- Boutigny, A. L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L. and Richard-Forget, F. (2009): Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Reserarch* 13, 746–753.
- Burgess, L. W., Klein, T. A., Bryden, W. L. and Tobin, N. F. (1987): Head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* Group I in New South Wales in 1983. *Australasian Plant Pathology* 16, 72–78.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Soleimani, M. J. and Yousefi, A. R. (2010): Occurrence, pathogenicity and distribution of *Fusarium* spp. in stored wheat seeds Kermanshah Province, Iran. *Pakistan J. Biological Sciences* 13, 1178–1186.
- Chehri, K., Maghsoudlou, E., Asemani M., and Mirzaei, M. R. (2011): Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with head blight of wheat in Iran. *Pak. J. Bot.*, 43, 2607–2611.
- Chen, H. K., Wang, G. and Jiang, X. (1982): Studies on *Fusarium* species infecting spikes of wheat and barley in Zhejiang Province. *Acta Phytopathologica Sinica* 12, 1–12.
- Chilaka, C. A., De Boevre, M., Atanda, O. O. and De Saeger, S. (2018): Quantification of *Fusarium* mycotoxins in Nigerian traditional beers and spices using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Food Control* 87, 203–210.

- Djaoubou, S., Moussaoui, A., Meddah, B., Makhloufi, S., Gouri, S. and El Khatib, R. (2018): Antifungal activity of some indigenous lactic acid bacteria isolated from soft wheat. *J. Pure and Applied Microbiology*. 12, 111–118.
- Ferreira-Geraldo, M. R., Tessmann, D. J. and Kemmelmeier, C. (2006): Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in southern Brazil. *Brazilian J. Microbiology* 37, 58–63.
- Foroud, N. A. and Eudes, F. (2009): Trichothecenes in Cereal Grains. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 147–173.
- Franco, T. S., Garcia, S., Hirooka, E. Y., Ono, Y. S. and Dos Santos, J. S. (2011): Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *J. Appl. Microbiology* 111, 739–748.
- Gilbert, J. and Tekauz, A. (2000): Review: recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian J. Plant Pathology* 22, 1–8.
- Guimarães, A., Venancio, A. and Abrunhosa, L. (2018a): Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives and Contaminants: PART A*, 1–16.
- Guimarães, A., Santiago, A., Teixeira, J. A., Venâncio, A. and Abrunhosa, L. (2018b): Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *International J. Food Microbiology*. 264, 31–38.
- Hornok, L. (2007): Sexual and vegetative compatibility/incompatibility in *Fusarium* Species. *Acta Phytopathol. et Entomol. Hung.* 42, 291–296.
- James, A. and Zikankuba, V. L. (2018): Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in Sub-Sahara. *Africa Food Control* 90, 72–81.
- Kaktcham, P. M., Zambou Ngoufack, F., Foko Kouam, E. M., Oana, C., Matei, F., Cornea, C. P. and Israel-Roming, F. (2018): Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from peanuts, gari, and orange fruit juice against food aflatoxigenic molds. *Food Biotechnology* 32, 237–256.
- Khalef, A., Zidane, C., Charef, A., Gharbi, A., Tadjerouna, M., Betbeder, A. M. and Creppy, E. E. (1993): Human ochratoxicosis in Algeria. In: E. E. Creppy, M. Castegnaro, G. Dirheimer (eds.): *Human Ochatoxicosis and its Pathologies*. INSERM/John Libbey Eurotext, Montrouge and France, pp. 123–127.
- Kim, H. S., Lee, T., Dawlatana, M., Yun, S. H., and Lee, Y. W. (2003): Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol- and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycol. Res.* 107, 190–197.
- Klich, M. A. (2002): Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*. 94, 21–27.
- Korn, U., Müller, T., Ulrich, A. and Herta-Müller, M. E. (2011): Impact of aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates on yield parameters and mycotoxins production in wheat. *Mycotox. Res.* 27, 195–206.
- Langseth, W. and Rundberget, T. (1999): The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*. 147, 157–165.
- Leslie J. F. and Summerell, B. A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa and USA. 368 p.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Manes, J. and Meca, G. (2017): In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT – Food Science and Technology*. 81, 128–135.
- Malachova, A., Stockova, L., Wakker, A., Varga, E., Krska, R. and Michlmayr, H. (2015): Critical evaluation of indirect methods for the determination of deoxynivalenol and its conjugated forms in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 6009–6020.
- Mastanjević, K., Šarkanj, B., Mastanjević, K., Šantek, B. and Krstanović, V. (2018): *Fusarium culmorum* mycotoxin transfer from wheat to malting and brewing products and by-products. *World Mycotoxin J.* 12, 55–66.
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A. and Alexander, N. J. (2011): Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3, 802–814.
- Miller, J. D. (2016): Mycotoxins in food and feed: A challenge for the twenty-first century. In: D.-W. Li (ed.): *Biology of Microfungi, Fungal Biology*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 469–493.
- Nagaraja, H., Chennappa, G., Poorna Chandra Rao, K., Mahadev Prasad, G. and Sreenivasa, M. Y. (2016): Diversity of toxic and phytopathogenic *Fusarium* species occurring on cereals grown in Karnataka State, India, 3 *Biotech.* 6, 57.

- Nelson, P. E., Plattner, R. D., Shackelford, D. D. and Desjardins, A. E. (1991): Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2410–2412.
- Orlando, B., Grignon, G., Vitry, C., Kashefifard, K. and Valade, R. (2019): *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Research* 35, 369–380.
- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A. and Arendt, E. K. (2012): Green preservatives: Combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Advances in Food and Nutrition Research.* 5, 215–236.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (2009): *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. Springer: (Springer Science + Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA), 519 p.
- Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2008): Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International J. Food Microbiology.* 122, 85–92.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2010): *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology.* 48, 2772–2777.
- Saladino, F., Luz, C., Manyes, L., Fernandez-Franzon, M. and Meca, G. (2016): *In vitro* antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* 67, 273–277.
- Shephard, G. S., Westhuizen, L. V. D., Gatyeni, P. M., Katerere, D. R., and Marasas, W. F. O. (2005): Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? *J. Agric. Food. Chem.* 53, 9293–9296.
- Tahani, N., Serghini-Caid, H., Ouzouline, M. and Elamrani, A. (2008): Mycologia of soft wheat: technological quality of grain and consequences on final products. *Reviews in Biology and Biotechnology.* BioAlliance Canada-Morocco. 7, 27–32.
- Tan, M. K. and Niessen, L. M. (2003): Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals *Mycol. Res.* 107, 811–821.
- Tančić Živanov, S., Nešić, L., Jevtić, R., Belić, M., Ćirić, V., Lalošević, M. and Veselić, J. (2017): Fungal diversity as influenced by soil characteristics. *Zemdirbyste-Agriculture.* 104, 305–310.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Sheperd, G. S., Gelderblom, W. C. A., and Niewenhuis, J. J. (1991): Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl Environ. Microbiol.* 57, 1089–1093.
- Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S., Dammak, M., Mseddi, A., Gdoura, R. and Triki, M. A. (2017): Morphological and molecular characterization of *Fusarium spp.* associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech.* 7, 28.
- Van der Fels-Klerx, H. J., De Rijk, T. C., Booij, C. J. H., Goedhart, P. W., Boers, E. A. M., Zhao, C. and Van der Lee, T. A. J. (2012): Occurrence of *Fusarium* Head Blight species and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat in the Netherlands in 2009. *Food Addit. Contam. A.* 29, 1716–1726.
- Vismera, H. F., Shepharda, G. S., Van der Westhuizenb, L., Mngqawaa, P., Bushula-Njahc, V. and Leslie, J. F. (2019): Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro. *International J. Food Microbiology* 296, 31–36.
- Weidenbörner, M., Wiczorek, C., Appel, S. and Kunz, B. (2000): Whole wheat and white wheat flour-the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology.* 17, 103–107.
- Xu, X. M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., Cooke, B. M., Doohan, F. M., Brennan, J. M., Moretti, A., Tocco, G., Mule, G., Hornok, L., Giczey, G. and Tatnell, J. (2005): Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 143–154.
- Yazar, S. and Omurtag, G. Z. (2008): Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2062–2090.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T. J., Aoki, T., Kistler, H. C. and O'Donnell, K. A. (2009): Novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101, 841–852.
- Zhang, J. B., Li, H. P., Dang, F. J., Qu, B., Xu, Y. B., Zhao, C. S. and Liao, Y. C. (2007): Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research* 111, 967–975.