



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم. الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des Mycètes

Intitulé :

Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées
à partir des grains de blé dur (traités et non traités)

Présenté et soutenu par :Mahideb Nesrine

Le 24 /06/2015

Merrouche Hadjer

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me}Mihoubi I. (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : M^{elle}Benserradj O. (Docteur – Centre universitaire de Mila).

Examineur : M^{elle} Abdelaziz W . (Maitre-assistant A - UFM Constantine).

**Année universitaire
2014 - 2015**

Remerciements

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à **Dieu** qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à madame **Benserradj Ouafa** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération à madame **Mihoubi I** Professeur à UFM Constantine et madame **Abdelaziz W** Maitre assistant A UFM Constantine d'avoir accepté de juger ce travail*

*Un grand MERCI à Monsieur **Kacem-Chaouche** qui nous a fait découvrir et aimer le monde des mycètes.*

*MERCI à Madame **Mosbah** pour la qualité de son enseignement et ses valeurs humaines.*

*MERCI à Monsieur **Heddi** pour tous les efforts fournis*

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LAMYBAM) mesdames **GHORRI Sana, Amina, Ahlem, Anissa** Pour leur gentillesse et serviabilité*

Dédicace

*Avec un énorme plaisir. Un cœur ouvert et une immense joie. Que je dédie ce modeste travail à mes chers et magnifiques **Parents** en témoignage de mon affection illimitée qu'il me soit permis de leur exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance éternelle pour tout ce qui m'ont offert au cours de mes longues années d'études.*

*A mes sœurs **Meysoun** et **Chourouk***

En leurs souhaitant beaucoup de succès dans la vie

A mon binôme

Hadjer

A toutes mes camarades de promotion surtout

Manel ,Adjel, Besma, Selsabil ,Amira, Narimene, Rokaya

Baraa

NESRINE

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : Les grains de blé	3
1. Définition.....	3
2. Position systématique.....	3
3. Structure des grains de blé.....	4
4. Importance du blé.....	5
5. Stockage du blé.....	5
5.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie.....	6
5.2. Stockage du blé en silos.....	6
6. Facteurs d'altération du blé.....	6
6.1. Altération d'origine environnementale.....	6
6.2. Altérations enzymatiques.....	7
6.3. Altération d'origine mécanique ou physique.....	7
6.4. Altération d'origine biologique.....	7
7. Procédés de traitement des grains.....	10
7.1 La lutte chimique.....	10
7.2 .La lutte physique.....	11
7.3. La lutte biologique (<i>Trichoderma</i>).....	11
Chapitre II : Les moisissures pathogènes du blé	12
1. Caractères généraux.....	12
2. Besoins nutritifs et activités biologiques.....	12
3. La mycoflore du blé.....	13
3.1. Flore des champs.....	14
3.2. Flore intermédiaire.....	15
3.3. Flore de stockage.....	15
4. Isolement des moisissures.....	17

5. Identification des moisissures.....	17
Chapitre III : Les mycotoxines	18
1. Nature et origine des mycotoxines.....	18
2. Effets des mycotoxines.....	18
3. Les moisissures mycotoxinogènes.....	19
3.1. Les Aflatoxines.....	20
3.2. Les Ochratoxines.....	21
3.3. Les Trichothécènes.....	21
3.4. Les Zéaralénones.....	21
3.5. Les Moniliformines.....	21
4. Facteurs de biosynthèses.....	21
4.1 Facteurs physiques (facteurs extrinsèques).....	21
4.2. Facteurs chimiques (facteurs extrinsèques).....	22
4.3. Facteurs biologiques (facteurs intrinsèques).....	23
Matériel et méthodes	24
1. Etude mycologique des grains de blé (traités et non traités).....	24
1.1. Echantillonnage.....	24
1.2. Milieux de culture.....	24
1.2.1. Milieu de potato dextrose agar (PDA).....	24
1.2.2. Milieu Dichloran Rose Bengal (DRBC).....	24
1.2.3. Milieu de Coconut extract agar (CEA).....	25
1.3. Isolement de la flore fongique.....	25
1.3.1. Méthode directe.....	25
1.3.2. Méthode indirecte.....	26
1.3.3. Méthode de filter paper soaked (SFP : filter paper soaked with NaCl solution)	28
1.4. Purification des isolats.....	28
1.5. Identification des isolats.....	29
1.5.1. Etude des caractères cultureux.....	29
1.5.2. Etude des caractères morphologiques microscopiques.....	29
2. Etude mycotoxicologique.....	29
2.1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat.....	29
2.2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation.....	31

2.2.1. Préparation du milieu de fermentation.....	31
2.2.3. Ensemencement du milieu de fermentation.....	31
2.2.4. Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation.....	31
2.3. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)....	33
2.4. Détection des mycotoxines par la chromatographie liquide a haute performance (HPLC).....	33
3. Approche a la lutte biologique contre les moisissures mycotoxinogènes isolées.....	35
3.1. Recherche des agents antagonistes aux champignons pathogènes des grains de blé.....	35
3.2. Test d'antagonisme par confrontation directe.....	35
3.3. Mesure de la croissance mycélienne.....	36
3.4. Evaluation de la sporulation.....	36
Résultats.....	37
1. Etude mycologique des grains de blé (traités et non traités).....	37
1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de blé.....	37
1.2. Identification des souches fongiques isolées.....	40
1.2.1. Identification macroscopique	40
1.2.2. Identification microscopique	46
2. Etude mycotoxicologique.....	53
2.1. Révélation des mycotoxines au niveau des substrats.....	53
2.2. Analyse des mycotoxines par CCM.....	53
2.3. Analyse des mycotoxines par HPLC.....	57
3. Approche de la lutte biologique (Test de confrontation directe).....	59
3.1. Effet sur la croissance mycélienne.....	59
3.2. Effet sur la sporulation.....	63
Discussion.....	64
Conclusion et perspectives.....	68
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumés	

Liste des abréviations

AFB1	Aflatoxine Blue 1
A _w	Activité de l'eau
CCM	Chromatographie couche mince.
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
KGy	Kilogray, unité de mesure de dose absorbée du Système international, valant 103 grays.
CEA	Coconut extract agar
CYA	Czapek Yeast Agar
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chlorotétracycline
PDA	Potato Dextrose Agar
OTA	Ochratoxine A.
R _f	Rapport frontal
SFP	Filter paper soaked with NaCl solution
tr	Temps de retention
UV	Ultra-violet.

Liste des figures

Figure01.Coupe schématique d'un grain de blé

Figure 02. : Quelques moisissures rencontrées dans le grain de blé, observation au microscope optique (X100)

Figure03 :Ensemencement des grains de blé sur PDA

Figure04 :Ensemencement des grains de blé sur CEA

Figure 05 : Techniques d'isolement et de dénombrement des souches fongiques isolées à partir des grains de blé par la méthode indirecte

Figure 06 : Isolement par la méthode de filter paper soaked

Figure07 :Détection des mycotoxines au niveau du substrat

Figure 08. Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide

Figure 09 : Extraction des métabolites secondaires

Figure 10: Evaporation sous vide a l'aide d'un rotavapeur

Figure 11 : Préparation de la plaque CCM

Figure 12 : Système HPLC (Laboratoire technique FACS NV université frères mentouri.

Figure 13: Confrontation entre l'isolat pathogène et une souche antagoniste par contact direct sur milieu PDA

Figure 14 : La flore fongique isolée sur le milieu PDA à partir du blé traité et non traité

Figure 15 : La flore fongique isolée sur le milieu RB à partir du blé traité et non traité

Figure 16 : La flore fongique isolée sur le milieu CEA à partir du blé traité et non traité

Figure 17: Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par A : *A.niger*

Figure 18: Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *A.flavus*

Figure 19: Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *A.fumigatus*

Figure 20: Chromatogramme de l'analyse par HPLC-UV de l'extrait brut de l'*A.niger*

Figure 21:Chromatogramme de l'analyse par HPLC-UV de l'extrait brut de l'*A.flavus*

Figure22:Chromatogramme de l'analyse par HPLC-UV de l'extrait brut de l'*A.fumigatus*

Figure 23 : Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp1 et Trichoderma sp2* sur la croissance mycélienne d'*A .niger*

Figure 24 : Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp1 et Trichoderma sp2* sur la croissance mycélienne d'*A .flavus*

Figure 25: Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp1 et Trichoderma sp2* sur la croissance mycélienne d'*A .fumigatus*

Figure 26 : L'analyse statistique d'*A. flavus ,A. fumigatus et A. niger*

Liste des tableaux

Tableau 01 : Position systématique du blé dur

Tableau 02. Consommation moyenne (kg/hab/an) algérienne de céréales, entre 1961-2005

Tableau 03. Principaux genres bactériens rencontrés sur le grain de blé

Tableau 04: Les principales mycotoxines et leurs effets

Tableau 05: Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines

Tableau 06 : Programme gradient utilisé pour l'analyse et la séparation du métabolite

Tableau 07 : les différents genres fongiques obtenus à partir de blé traité et non traité

Tableau 08 : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé traités

Tableau 09 : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains du blé non traités

Tableau10 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé traités

Tableau 11 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé non traités

Tableau 12 : Les valeurs R_f des spots séparé par la CCM

Tableau 13 : Effet de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne d *A.niger*, *A. flavus* et *A. fumigatus*

Tableau 14: Taux d'inhibition exercé par l'antagoniste vis a vis *A. niger*, *A.flavus* et *A.fumigatus*

Introduction

Les grains de céréales constituent, depuis toujours, la principale ressource alimentaire de l'Homme et de l'animal et possèdent un pouvoir nutritionnel important. Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage.

Malheureusement, de nombreux agents de détériorations (vertébrés, insectes, moisissures, acariens,...) sont la cause de la perte d'une grande partie des récoltes de céréales. Les moisissures et leurs métabolites secondaires entraînent, à l'échelle mondiale, des pertes de céréales et leurs dérivées estimées de 5 à 10% (Pfohl-Leszkowicz , 1999).

Les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Elles sont omniprésentes dans la nature et possèdent un arsenal enzymatique très varié, ce qui leur permet de croître sur divers substrats. Les moisissures diminuent la qualité technologique (taux du gluten) et sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et animales) réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économiques dus aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés.(Gacem ,2012)

La sécrétion des métabolites secondaires hautement toxiques, par les champignons mycotoxinogènes au cours de leur prolifération sur les céréales stockées, constitue un danger réel pour la sécurité sanitaire de l'Homme et de l'animal. En Angleterre, en 1960, l'ingestion d'une farine importée du Brésil, contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de volailles. Cet événement dénommé autrefois tout simplement « Turkey- X- Disease » a donné le départ d'une série d'études et de recherches sur les substances actives élaborées par les moisissures. D'ailleurs, dans la même année (1960), le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle toxine (Tantaoui , 1977).

D'après Steyn (1998), les aflatoxines sont sécrétées par des souches d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*, alors que pour les ochratoxines, elles sont élaborées par *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus niger*. Ces mycotoxines sont caractérisées par leur fluorescence sous les rayons UV et par leur thermorésistance (Kurtzman *et al.*, 1987).

Avec la révolution dans le domaine agro-alimentaire, l'espèce humaine doit maximiser sa production alimentaire afin d'assurer une alimentation adéquate pour la population mondiale.

Pour ce faire elle doit réduire l'abondance des espèces qui sont en compétition alimentaire avec elle et mettre ces produits à l'abri de toutes altérations (Khelil, 1977).

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les moisissures nuisibles (Magan *et al.*, 2004). Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telles que la faune auxiliaire et l'apparition des microorganismes résistants. Ces dangers ont conduit l'OMS à interdire l'usage de certains fongicides chimiques, d'autres vont être prohibés dans un futur proche (Khelil, 1977).

Il est devenu très indispensable la recherche de molécules nouvelles en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers un essai de la lutte biologique par l'utilisation de souches fongiques antagonistes pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'étudier la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur (traités et non traités) et mettre en évidence l'activité biologique des antagonistes (*Trichoderma sp*) sur la croissance des moisissures mycotoxinogènes des grains de cette céréale.

- Pour ce faire, une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre étude a été réalisée afin de regrouper les informations essentielles sur le blé dur et les éventuelles moisissures toxiques et leurs métabolites (mycotoxines) pouvant altérer cette céréale.
- La deuxième partie de notre étude, illustre le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus.
- L'étude est achevée par une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenus et des perspectives

Revue Bibliographique

Chapitre 1 : Les grains de blé

1. Définition

Le blé est l'une des principales céréales cultivées dans le monde, avec le riz, le maïs, l'orge et le sorgho. Elles fournissent plus de 60% des calories et des apports en protéines de l'alimentation humaine. Une des particularités du blé réside dans la forte teneur en amidon (70%) et en gluten (15%) de ses grains. Le blé est au centre de l'alimentation humaine en tant qu'ingrédient principal pour la fabrication du pain, de la semoule, des biscuits et des pâtes (Zouaou, 2012).

L'espèce majoritairement cultivée (>90% des cultures) est le blé tendre *Triticum aestivum* ssp. *aestivum*, utilisé principalement pour la fabrication du pain. Le blé dur *Triticum turgidum* ssp. *durum* est utilisé pour la fabrication des pâtes alimentaires et des semoules (5% de la production de blé). C'est la différence de dureté du grain (dur ou tendre) qui les destine à ces utilisations différentes (Zouaou, 2012).

2. Position systématique

Le blé est une monocotylédone de la famille des Poaceae appartenant au genre *Triticum*. D'après Doumandji *et al* (2003), le blé dur appartient à la classification illustré dans le (Tableau 01).

Tableau 1 : Position systématique du blé dur (Doumandji *et al.*, (2003)

Règne	végétal
Embranchement	Stomatifères
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Glumales
Famille	Graminées(graminacées),(Poacées)
Genre	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum turgidum</i> (synonyme : <i>Triticum durum</i>)

3. Structure des grains de blé

Physiologiquement, le grain des *Poacées* est un caryopse blanc ou roux, ovoïde, pesant de 35 à 45 mg (le grain est soudé aux parois de l'ovaire) jouant le rôle d'un fruit renfermant une graine, (cotylédon qui représente 82 à 85% du grain) (Godon, 1991).

L'espèce *Triticum durum* est composée de trois parties essentielles (l'enveloppe, l'amande farineuse et le germe). Chacune de ces parties est formée de réseaux très complexes qui font encore l'objet de nombreuses recherches (Cheftel *et al.*, 1977).

Le germe qui donne la plantule, l'amande appelée endosperme ou albumen, tissu de stockage qui fournit au germe les réserves nécessaires pour sa croissance et les enveloppes protectrices sont composées par la paroi de la graine (testa) et par la paroi du fruit (péricarpe)(Doumandji *et al.*, 2003).

La structure des grains de diverses céréales est assez semblable. La figure 01 illustre les différentes parties composant une graine de blé.

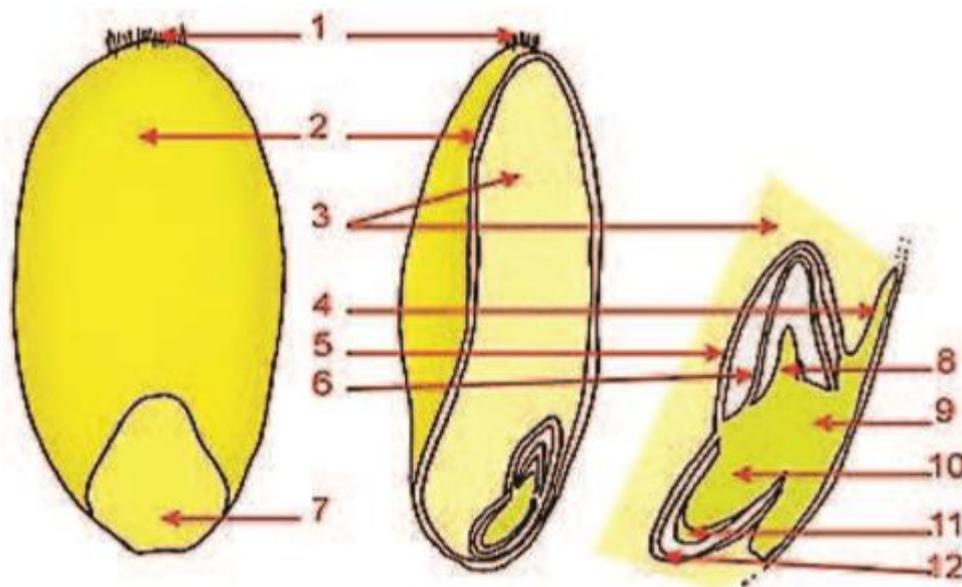


Figure 01. Coupe schématique d'un grain de blé (Cheftel et Cheftel, 1977).

(1) : poils (stigmates). (2) : téguments (écorce). Le caryopse est un fruit car l'écorce est le résultat de la fusion des téguments de la graine et de la paroi de l'ovaire. (3) : albumen. (4) : cotylédon unique. (5) : épicotyle (capuchon recouvrant la gemmule). (6) : première feuille. (7) : scutelum. (8) : gemmule. (9) : tigelle. (10) : radicule. (11) : coiffe. (12) : coléorhize (capuchon recouvrant la radicule).

4. Importance du blé

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (Slama *et al.*, 2005). Parmi ces céréales, le blé occupe la première place pour la production mondiale et la deuxième après le riz, comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15% de ses besoins énergétiques (Bajji, 1999). Le blé est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climat arides et semi-arides. Ces régions se caractérisent par l'augmentation de la température couplée à la baisse des précipitations, en plus la désertification et la sécheresse (Abeledo *et al.*, 2008).

Actuellement, l'Algérie est un grand importateur de blé et se trouve dépendante du marché international (Anonyme, 2006). Cette situation risque de se prolonger à plusieurs années, faute de rendements insuffisants et des besoins de consommation sans cesse croissants (Tableau 02) devant une forte évolution démographique (Chellali, 2007).

Tableau 02. Consommation moyenne (kg/hab/an) algérienne de céréales, entre 1961-2005 (Fao, 2007).

Périodes	1961	1970	1980	1990	2000	2003	2005
Consommation	110	120	182	193	190	201	215

5. Stockage du blé

La consommation quotidienne est assurée par une seule récolte, quelquefois deux dans l'année d'où la nécessité du stockage. En outre, les grains stockés sont utilisés comme des semences en attendant la saison suivante (Druvefors, 2004). Plus l'humidité des grains est importante à la récolte, plus les conditions sont favorables au développement des microorganismes. De bonnes pratiques de conservation consistent à éviter son altération en contrôlant les principaux facteurs de détérioration (Molinie *et al.*, 2005).

Autrement dit, le but des technologies de conservation est de préserver par des moyens appropriés l'intégrité des principales qualités des graines qui ne peuvent pas être améliorées pendant le stockage (Chawla, 1984). Les premiers systèmes de stockage

étaient de grands paniers faits de roseaux ou fioles d'argiles qui sont enfoncées dans le sol, ainsi que des puits, des structures de bois et des puits garnis de paille (Druvefors, 2004).

5.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie

Le paysan algérien, sur les hauts plateaux, conservait surtout le produit de ses champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées dans un sol argileux ; c'est ce qu'on appelle « El matmour » ou dans des sacs en toile de jute, entreposés dans divers locaux, magasins ou hangars. La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes (Doumandji *et al.*, 2003).

5.2. Stockage du blé en silos

De nos jours, les silos permettent de stocker les différents types de céréales en même temps ; ils s'agit de multi-produits (Duron, 1999). Ce sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal inoxydable. L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux (Doumandji *et al.*, 2003).

6. Facteurs d'altération du blé

6.1. Altération d'origine environnementale

- **L'humidité**

La faible teneur en humidité est le facteur le plus important pour la conservation des grains lors du stockage. Les grains, stockés avec le contenu d'humidité élevé, sont soumis à des pertes élevées causées par l'attaque des insectes et des champignons (Vasquez *et al.*, 2008). Elle favorise la respiration des grains et accentue en conséquence le dégagement de chaleur au sein des grains stockés (Cruz *et al.*, 2002).

- **La température**

La température joue un rôle important dans la conservation des grains (Cruz *et al.*, 2002). Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité du grain au cours de stockage (Kusinska, 2001). Elle intervient d'une part sur la valeur de l' A_w et d'autre part sur les vitesses de réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes

(Richard-Molard, 1998). Au cours de la conservation, plus la température est élevée plus les réactions biologiques des microorganismes sont rapides (Multon, 1982).

6.2. Altérations enzymatiques

Les altérations enzymatiques dues aux enzymes propres aux grains se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies (Multon, 1982). C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxygénase. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation (Afnor, 1986). Les réactions de Maillard donnent aussi un grand nombre de composés intermédiaires (dont l'activité physiologique a été reconnue) aboutissant dans leur stade ultime à la formation de composés brunâtres avec une destruction des vitamines B1, E et les caroténoïdes (Afnor, 1986).

6.3. Altération d'origine mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des cassures et favorisant les autres causes d'altération. L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (Afnor, 1986).

6.4. Altération d'origine biologique

Un lot de grains entreposé comporte inévitablement au moins deux entités vivantes : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) (Multon, 1982).

La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique (Magan *et al.*, 2003). Les virus paraissent négligeables, et les lichens sont parmi les rares organismes vivants capables de supporter sans dommage une grande siccité : leurs teneurs en eau se situent entre 5 et 40%, contre 75 à 97% pour le reste du monde vivant (Multon, 1982).

- **Les macroorganismes**

Divers petits vertébrés rongeurs (souris, rats et oiseaux) peuvent vivre aux dépens des stocks de grains mal protégés, dont ils peuvent consommer des quantités considérables (Multon, 1982). De plus ils peuvent jouer le rôle d'un vecteur de germes pathogènes provoquant des contaminations et des lésions physiques dans les tissus végétaux qui favorisent donc la pénétration des spores (Jouany *et al.*, 2002).

La présence de la plupart des arthropodes, et singulièrement d'acariens, est révélatrice de mauvaises conditions de conservation. Les acariens vivant sur les grains moisissus, récupèrent et transportent les spores de champignons sur leur corps, mais également dans leur tube digestif et leurs fèces. Beaucoup d'acariens consomment les moisissures, préférant d'ailleurs les espèces les plus abondantes (Molinie *et al.*, 2005).

Les insectes, endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration des moisissures à l'intérieur de la graine. Quelques insectes disséminent des espèces mycotoxigéniques. Là où les insectes et les rongeurs sont contrôlés, les moisissures sont souvent la cause unique de la détérioration (Magan *et al.*, 2003).

- **Les microorganismes**

Les grains fraîchement récoltés constituent une niche écologique pour plusieurs types de bactéries (Tableau 03). La population bactérienne est essentiellement constituée par des eubactéries qui renferment une très forte proportion d'entérobactéries, notamment de coliformes qui sont toujours abondantes sur les céréales (Withlow *et al.*, 2001).

Tableau 03. Principaux genres bactériens rencontrés sur le grain de blé (Bourgeois *et al.*, 1996).

Familles	Genres et espèces	Pourcentage des grains contaminés %
Bacillaceae	<i>B.cereus</i>	18
	<i>B.subtilis</i>	36
Entérobactériaceae	<i>Acrobacter sp</i>	54
	<i>Escherichia coli</i>	9
	<i>Paracolobacterium sp</i>	90
Lactobactériaceae	<i>Leuconostocsp</i>	9
	<i>Lactobacillus sp</i>	Présence
	<i>Streptococcus sp</i>	Présence
Micrococcaceae	<i>M.candidus</i>	48
	<i>M.caseolyticus</i>	48
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp</i>	73

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

Des très grands nombres de moisissures sont capables de détériorer les denrées alimentaires. Ces moisissures sont le plus souvent des saprophytes banaux. La mycoflore est estimée entre 200 000 et 300 000 espèces (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les plus répandues sont les *Penicilliums* et les *Aspergillus* qui sont aérobies strictes (omniprésentes dans la nature), hétérotrophes, peu exigeantes et possédant un potentiel élevé de sécrétion d'enzymes exo-cellulaires. Ces types de moisissures sont capables de se développer sur toutes sortes de nourriture : céréales, viande, lait, fruits, légumes...etc (Filtenborg *et al.*, 1996).

7. Procédés de traitement des grains

Mettre les grains à l'abri d'altérations, c'est prendre un ensemble de mesures qui sont applicables à toutes les étapes de la vie des grains, depuis la récolte (et même avant) jusqu'à leur utilisation (Multon, 1982)

Qualité initiale des grains, maîtrise de la température, de l'humidité et de la composition du milieu ambiant, traitements physiques et chimiques, sont la clé du contrôle de l'activité microbienne (Multon, 1982). Il existe plusieurs méthodes de traitement des grains

7.1 La lutte chimique

Des acides organiques de faible poids moléculaire (acide propionique, acide acétique et acide formique) et leurs sels sont les plus employés pour conserver les grains (Magan *et al.*, 2004).

Cependant, ils ont beaucoup d'inconvénients : leur efficacité dépend du temps ; ils sont corrosifs ; les traitements de l'acide détruisent la viabilité de la graine; et, surtout, le soin spécial doit être pris par l'utilisateur pour éviter l'inhalation.

Dans quelques cas, la production des mycotoxines accrue est observée dans le grain traité à l'acide. Quelques mycètes peuvent utiliser ces acides comme source de carbone (Tatsadjieu *et al.*, 2009).. Actuellement, il ya une tendance mondiale de réduire au minimum, ou même interdiction de l'utilisation des pesticides dans les produits agricoles, ce qui donne l'urgence à la recherche des méthodes alternatives de conservation des grains (Bankole, 1997 ; Tatsadjieu, *et al.*, 2009).

Les traitements des grains humides par l'ammoniac gazeux ou en solution dans le but d'inhiber le développement de leur microflore suscite actuellement un certain intérêt (Multon, 1982). Certaines substances chimiques utilisées pour faire face aux dégradations présentent un risque toxique non négligeable : c'est le cas de l'oxyde d'éthylène, du bromure de méthyle (Leyral *et al.*, 2003).

Ces produits causent l'induction des phénomènes de résistance des genres mycotiques pathogènes et l'accumulation des résidus (Flamini *et al.*, 2003). L'aldéhyde formique a été utilisé avec succès pour lutter contre le développement des moisissures des grains, mais son emploi pose également de nombreux problèmes (odeur, couleur, perte d'activité enzymatique) (Flamini *et al.*, 2003).

7.2 .La lutte physique

Des méthodes physiques se sont généralement appliquées dans le stockage des grains. Les atmosphères modifiées et l'irradiation gamma devraient être mentionnées. L'action létale de l'irradiation sur les organismes vivants résulte de modifications chimiques, même quantitativement infimes, induites dans leurs molécules vitales. Les champignons producteurs de toxines sont plus sensibles que d'autres à l'irradiation (Magan *et al.*, 2004). Les moyens physiques réduisent ou éliminent l'utilisation des produits chimiques, cependant, beaucoup de facteurs pratiques, techniques aussi bien que biologique, continuent à limiter l'utilisation des atmosphères modifiées et l'irradiation gamma (Magan *et al.*, 2004). Les doses de rayonnements ionisants suffisantes pour remplacer les produits chimiques sont très faibles : 0.4 à 1 KGy (Leyral *et al.*, 2003).

7.3. La lutte biologique

Des levures, et des bactéries nombreuses se sont avérées efficaces dans le contrôle du produit agricole frais après récolte. Les mécanismes par lesquels la croissance fongique et la production des mycotoxines peuvent être empêchées dans l'environnement concurrentiel incluent : la concurrence pour les nutriments ; l'induction des mécanismes de défense ; les interactions hyper parasitiques. Bien que le contrôle biologique ne semble pas encore être faisable sur les grains, un avantage important qui pourrait émerger des études sur les mycètes antagoniques serait la découverte des composés inhibiteurs à la production de mycètes et/ou de mycotoxines de stockage (Magan *et al.*, 2004)

La grande majorité des antifongiques naturels est d'origine microbienne et près de la moitié est synthétisée par les actinomycètes, en particulier par les *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Eckwall *et al.*, 1998) .

Chapitre 2 : Les moisissures pathogènes du blé

1. Caractères généraux

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (Nicklin *et al.*, 2000).

Les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques ; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon, 1982).

2. Besoins nutritifs et activités biologiques

Les champignons sont des hétérotrophes ; ils utilisent des composés organiques comme source de carbone. La digestion des grosses molécules doit commencer dans le milieu extérieur car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme.

La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes plus efficacement que les bactéries, tel que : la cellulose, la lignine, la kératine, les acides humiques etc. (Davet, 1997).

Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. Ces hydrates de carbone sont dégradés grâce à la glycolyse et le métabolisme aérobie (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). D'autres composés organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures, la lignine, la pectine et les lipides sont également dégradés par les moisissures à côté d'autres substrats organiques bon marché comme les déchets issus de l'industrie agroalimentaire (lactosérum, mélasses de canne ou de betterave, amidon de maïs, déchets d'agrumes etc.).(Nishio *et al.*, 1981 ; Joyeau, 1982 ; Hart *et al.*, 1991).

L'azote représente, quant à lui, le second élément chimique le plus important du matériel cellulaire, composé majeur des protéines et des acides nucléiques. Il constitue en moyenne 12% du poids sec cellulaire (Scriban, 1993) ; non assimilable sous forme d'azote atmosphérique par les moisissures. Ces dernières métabolisent le nitrate, l'ammonium, l'urée et les acides aminés plus facilement assimilables (Botton *et al.*, 1990). Les peptides et les protéines ne sont utilisés par les moisissures qu'après leur dégradation (Botton *et al.*, 1990 ; Nicklin *et al.*, 2000). Par ailleurs, des sources naturelles complexes sont souvent utilisées comme source azotée telle que : la caséine, les farines de poissons et de soja, le «corn steepliquor » etc. (Joyeau, 1982).

Le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène constituent les micronutriments, et sont disponibles en grande quantité dans l'environnement des moisissures (Nicklin *et al.*, 2000). Ils sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc... Par ailleurs, le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium et le soufre représentent les macronutriments requis par les moisissures et sont convertis en divers composés après réduction (Boiron, 1996).

Les facteurs de croissance sont des composés indispensables à la nutrition et à la croissance de certains microorganismes (Leclerc *et al.*, 1995). Les stérols, les acides gras, les purines et les pyrimidines constituent des facteurs de croissance en quantité relativement importante pour le développement d'un certain nombre d'espèces. Les stérols jouent un rôle majeur dans la constitution des membranes fongiques et leur perméabilité (Boiron, 1996).

Diverses vitamines sont également d'une grande importance pour leur croissance, en particulier la thiamine, la biotine intervenant comme coenzyme lors des carboxylations (Rivière, 1975 ; Botton *et al.*, 1990).

3. La mycoflore du blé

Plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses ont été trouvées sur les grains de céréales comme contaminants extérieurs. Les graines sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment

la quantité d'eau libre (A_w), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany *et al.*, 2002).

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

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

3.1. Flore des champs

Les grains de blé sont contaminés par les microorganismes dans le champ, et cette microflore est dominée par des moisissures (Deàk, 2008). Les spores des champignons de champ envahissent les grains et croissent dans le champ ou attendent le battage (Dendy *et al.*, 2000). Les genres rencontrés sont: *Alternaria* (le plus fréquent), *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Helminthosporium* (moins fréquents), *Chaetomium*, *Curvularia*, *Rhizopus* et *Stemphylium* (Sauer *et al.*, 1982 ; Zillinsky, 1983). Cette flore est bien adaptée à des changements rapides des conditions dans le champ. Elle exige des activités en eau relativement élevées pour une croissance optimale (Adams *et al.*, 2008). En fonction des conditions précises, ces champignons peuvent mourir lentement au cours du stockage ou peuvent survivre pendant de longues périodes. La survie est plus longue à basse température et à faibles niveaux d'humidité (Roberts, 2005).

Le genre *Alternaria* : Il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides (Dendy *et al.*, 2000). Les espèces les plus fréquentes sont : *Alternaria alternata* est connue par la production des mycotoxines ; *Alternaria tenuissima* est capable de produire des toxines tel que l'acide ténuazonique (Andersen *et al.*, 2002) et *Alternaria infectoria* cause la décoloration et la dévalorisation du grain mais elle est non toxino-génique (Webley *et al.*, 1997).

Le genre *Fusarium* : Il comprend les espèces qui ont à la fois des pouvoirs pathogènes et saprophytes. Les espèces rencontrées sont surtout : *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* (Van der Burgt *et al.*, 2009). Les champignons *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines.

Les deux espèces *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* peuvent causer la pourriture de la tige et la brûlure de l'épi du blé et ces infections de champ peuvent conduire à l'altération post récolte plus importante de ce produit s'il est stocké à une trop forte activité de l'eau (Adams *et al.*, 2008).

3.2. Flore intermédiaire

Elle est une catégorie à comportement plus diversifié et regroupe des germes capables d'un développement limité, au début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Les genres les plus rencontrés sont : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (Godon *et al.*, 1997).

3.3. Flore de stockage

Les facteurs environnementaux peuvent exercer une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques espèces mycotoxigéniques (Magan *et al.*, 2003).

Les moisissures des grains de blé stockés sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés. Les principaux genres rencontrés sont : *Aspergillus* et *Penicillium* en raison de leurs capacités de se développer sur tous substrats possibles et dans une large gamme de température et d'humidité (Mathew *et al.*, 2011).

Le genre *Aspergillus* : Chaque espèce de moisissures de stockage a ces conditions de développement (Christensen *et al.*, 1969). Dans le blé stocké, les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000). Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans le grain de blé stocké sont surtout : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* (Mathew *et al.*, 2011). Si le blé est stocké à une teneur d'humidité de 14 à 15% et à une température d'environ 70°C, il sera lentement envahi par d'autres espèces notamment *Aspergillus restrictus*. Cette dernière représente l'espèce qui prédomine dans le blé stocké pendant quelques mois si l'humidité est inférieure à 15%.

Au dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que : *Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus ruber* prédominant et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (Christensen *et al.*, 1969).

Le genre *Penicillium* : Les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (Neergaard, 1977 ; Boudreau *et al.*, 1992).

Les espèces les plus communes sont essentiellement : *Penicillium aurantiigriseum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium hordei*, *Penicillium freii*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium crustosum* (Dijksterhuis *et al.*, 2007) (Figure 02).

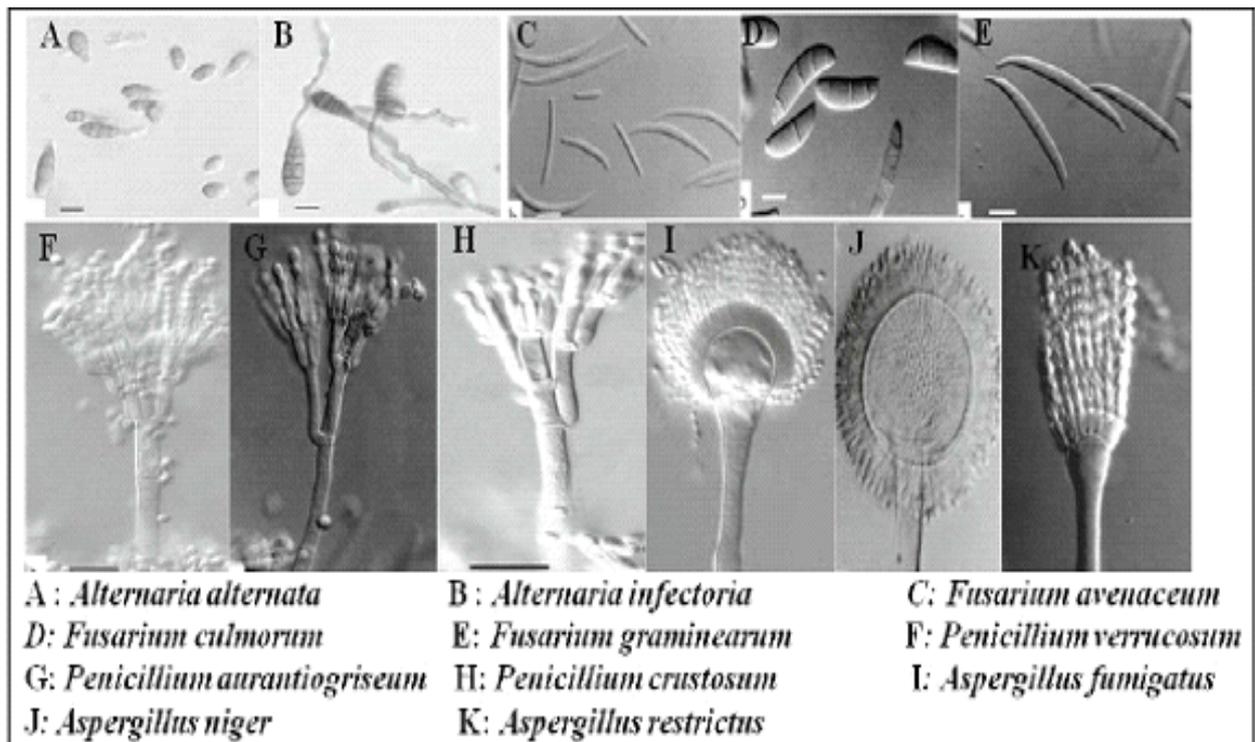


Figure 02. : Quelques moisissures rencontrées dans le grain de blé, observation au microscope optique (X100) (Pitt *et al.*, 2009).

4. Isolement des moisissures

Le choix des milieux de culture est aussi déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore du produit à analyser. Trois catégories de milieux peuvent être distinguées : les milieux de routine, peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures ; les milieux sélectifs adaptés à la recherche d'une espèce ou d'un groupe d'espèces à écologie particulière et difficile à mettre en évidence avec un milieu ordinaire ; les milieux différentiels utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles

5. Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (Tabuc, 2007).

Chapitre 3 : Les mycotoxines

1. Nature et origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, toxiques, de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons), excrétées par certaines moisissures qui se développent sur divers produits agricoles sous des conditions environnementales particulières (Krska, 2009).

A ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (Pamel *et al.*, 2010). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Ruppel *et al.*, 2004). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, stérigmatocystine), d'autres des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique) et les derniers sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, fusarénone,)(Leclerc *et al.*, 2005).

2. Effets des mycotoxines

Les mycotoxines constituent un danger imminent qui tire le signal d'alarme, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, sur la productivité animale et sur le commerce national et international. La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (Krska, 2009).

L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Mais, l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que le foie ou le rein (Leclerc *et al.*, 2005). Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets carcérrogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (Tableau 04).

En outre, certaines mycotoxines peuvent altérer des réactions immunitaires et réduire ainsi, la résistance aux infections. Du coup, il est, maintenant, largement considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (Pamel *et al.*, 2010).

Tableau 04: Les principales mycotoxines et leurs effets (Brochard *et al.*, 2009).

Mycotoxines	Effets avérés ou suspectés
Aflatoxines	Hépatotoxique- Mutagène- Cancérogène- Immunotoxique
Citrinine	Néphrotoxique
Fumonisine B1	Neurotoxique- Hépatotoxique- Immunotoxique- Cancérogène
Ochratoxines	Néphrotoxique- Cancérogène- Mutagène
Patuline	Neurotoxique- Mutagène (<i>in vitro</i>)
Pénitrème A	Neurotoxique
Stérigmatocystine	Cancérogène- Hépatotoxique
Trichothécènes	Cancérogène- Hépatotoxique- Immunotoxique- Hématotoxique
Zéaralénone	Ostrogénique- Effet sur la fertilité et la reproduction

3. Les moisissures mycotoxinogènes

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxinogène (Reboux, 2006). Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Pamel *et al.*, 2010). Parmi ces genres, seules certaines espèces et parfois, certaines souches au sein d'une espèce, sont capables d'excréter des mycotoxines (Ruppel *et al.*, 2004). Certaines mycotoxines sont étroitement liées à des espèces fongiques spécifiques alors que, d'autres sont élaborées par de nombreuses espèces appartenant à des genres différents (Tableau 05). Les mycotoxines sont produites soit, dans le champ lors du développement de la plante (toxines du champ) soit, après la récolte (toxine du stockage) (Afssa, 2009).

De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique (Tabuc, 2007).

Tableau 05: Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines (Atoui, 2006).

Mycotoxines	Moisissure
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus parasiticus, A. flavus</i>
Citrinine	<i>P. cltrinum, Monascusruber</i>
Déoxynivalénol(DON),Nivalenol, Fusarenone, Toxine T2	<i>F. tricinctum, Fusarium sp</i>
Fumonisines	<i>F. monoliforme, F. proliferatum, Fusarium sp</i>
Monolifirmine	<i>F. proliferum, F. subglutinans</i>
Ochratoxines A, B, C	<i>A. Ochraceus, A. carbonariu</i> <i>Penicillium verrucosum, P. nordicum</i>
Patuline	<i>P. ochraceus, P. cyclopium, P. puberulum</i>
Stérigmatocystine	<i>A .nidulans, A. versicolor</i>
Zéaralénone	<i>Fusarium roseum, Fusarium sp</i>

3.1. Les Aflatoxines

Les Aflatoxines sont des métabolites secondaires des moisissures connues pour être hautement toxiques et potentiellement cancérogènes. Elles ont été détectées dans diverses denrées alimentaires et sont actuellement considérées comme l'un des contaminants les plus dangereux de l'alimentation (Smith *et al.*, 1985). La famille des Aflatoxines est produite par les moisissures du genre *Aspergillus* qui se développent comme contaminants dans les grains stockés particulièrement pendant le stockage en milieu humide (Geacintov *et al.*, 2011).

3.2. Les Ochratoxines

Les Ochratoxines sont des métabolites produits par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* dans le blé stocké (Labbé *et al.*, 2001). La production des Ochratoxines s'effectue même à des températures n'excédant pas 5°C (Oms, 1980).

3.3. Les Trichothécènes

Les Trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par le genre *Fusarium* (Placinta *et al.*, 1999). Les trichothécènes sont généralement trouvés dans le monde entier dans les céréales telles que le blé, le maïs, l'orge et l'avoine. Ce sont des métabolites fongiques connus pour contaminer les grains stockés et d'autres produits agricoles (Ueno, 1977). La production de trichothécènes dépend de la température et de l'activité de l'eau.

3.4. Les Zéaralénones

L'occurrence de ces toxines est favorisée par l'élévation de la teneur en eau et la diminution de température. Des concentrations élevées de zéaralénones ont été mesurées dans le blé stocké dans des conditions humides (Agag, 2004).

3.5. Les Moniliformines

Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de production de ce groupe de mycotoxine dans le blé : *Fusarium moniliforme*. L'optimum de cette production est dans les températures chaudes 25-30°C (Xu *et al.*, 2003).

4. Facteurs de biosynthèses

4.1 Facteurs physiques (facteurs extrinsèques)

Les principaux facteurs physiques constituent l'ensemble des conditions environnementales telles que ; la température, la disponibilité en eau, l'infestation par les insectes et l'attaque des rongeurs (Mirete *et al.*, 2004).

- **Température**

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des moisissures et en outre sur la compétition entre les espèces. La plupart des

champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 °C à 35°C. Pour d'autres, ils sont psychrophiles ou psychrotolérantes (Botton *et al.*, 1990).

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Par ailleurs, les mycotoxines peuvent être élaborées à des températures généralement inférieures à celle de la croissance (Samson *et al.*, 2004). En ce qui concerne les *Aspergillus* de la section Nigri, de façon générale, la production d'OTA se fait dans un très large intervalle de température (Esteben *et al.*, 2004).

- **Activité de l'eau (A_w)**

Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer à une A_w inférieure à 0.65. Il s'agit d'un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures ainsi que sur la production de mycotoxines (Belli *et al.*, 2004).

- **pH**

Le pH du milieu est un facteur important pour la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses (Le baras *et al.*, 1987).

- **Endommagement des grains**

Les grains cassés, fissurés ou altérés par les insectes et les acariens constituent des foyers favorables pour le développement des moisissures qui, après leur envahissement libèrent les toxines (Le baras *et al.*, 1987).

4.2. Facteurs chimiques (facteurs extrinsèques)

- **Composition gazeuse**

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ a un effet dépresseur important sur la toxigénèse (Derache, 1986). Toutefois, après conservation dans une atmosphère confinée, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxigénèse (Le baras *et al.*, 1987).

- **Traitements agricoles**

La production des mycotoxines dans le champ peut être influencée par le labour, la rotation de récolte, les fongicides utilisés, la variété de la plante et les différences géographiques (Le baras *et al.*, 1987).

- **Nature du substrat**

La toxigénèse dépend beaucoup plus étroitement de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. Sur une denrée alimentaire, on trouve souvent une espèce dominante et donc ses toxines. Cependant, en général, la biogénèse des aflatoxines et de l'OTA, est favorisée tout d'abord par la présence des glucides dans le substrat, puis des lipides et enfin la présence des protides (Lund *et al.*, 2003).

4.3. Facteurs biologiques (facteurs intrinsèques)

Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines. De plus, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Le baras *et al.*, 1987).

Matériel et Méthodes

1. Etude mycologique des grains de blé (traités et non traités)

Le présent travail porte sur l'étude mycologique et mycotoxicologique des grains de blé traités et non traités. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie biotechnologie et de l'activité microbienne (Université frères mentouri Constantine)

1.1. Echantillonnage

Les analyses effectuées ont porté sur les grains de blé dur traités avec le Thirame et le Benzimidazole et les grains non traités qui nous ont été fournis par l'OAIC (office algérien interprofessionnel des céréales) de la wilaya de Constantine. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier stériles où ils sont soumis à des analyses microbiologiques et mycotoxicologiques.

1.2. Milieux de culture

Trois milieux synthétiques (composition en annexe) ont été utilisés pour l'isolement des moisissures à partir des grains (PDA, DRBC et CEA).

1.2.1. Milieu de potato dextrose agar (PDA)

Ce milieu est recommandé pour l'isolement et le dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires (Botton *et al.*, 1990) Il est à noter que la stérilisation, destinée à détruire tous les germes présents au départ dans le milieu, est réalisée dans un autoclave par de la vapeur d'eau sous pression, à haute température. La stérilisation a été pratiquée à 121°C pendant 20min (Botton *et al.*, 1990)

1.2.2. Milieu Dichloran Rose Bengal (DRBC)

Afin d'éviter la contamination bactérienne nous avons ajouté le rose Bengal au milieu PDA pour inhiber la croissance bactérienne et limiter la taille des moisissures dans la boîte de Pétri (Larpen, 1990).

1.2.3. Milieu de Coconut extract agar (CEA)

Cent grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée chaude. La solution a été filtrée à l'aide du tissu. L'agar a été ajouté (20 g/litre). Le mélange a été alors stérilisé à l'autoclave à 121°C/15 minutes. Le pH final est de 7. (Gacem, 2011)

1.3. Isolement de la flore fongique

Pour isoler la mycoflore des échantillons de blé considérés, nous avons utilisé deux méthodes:

1.3.1. Méthode directe

- Désinfection de la surface des grains

Les grains de chaque échantillon de blé ont été désinfectés en surface dans l'eau de javel puis dans l'éthanol, pendant une minute. Après deux rinçage à l'eau distillée stérile, les grains ont été séchés avec du papier filtre stérile pour être, ensuite, ensemencés (Pacin *et al.*, 2002 ; Ghiasian *et al.*, 2004).

Sous des conditions aseptiques, les grains désinfectés ont été placés directement, à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Figure 03) et le milieu CEA stérile (Figure 04) ,(5 boîtes pour chaque milieux), à raison de cinq grains par boîte. L'ensemble est incubé à $28\pm 4^{\circ}\text{C}$ pendant 4 à 6 jours.(Pacin *et al.*,2002 ; Ghiasian *et al.*, 2004).

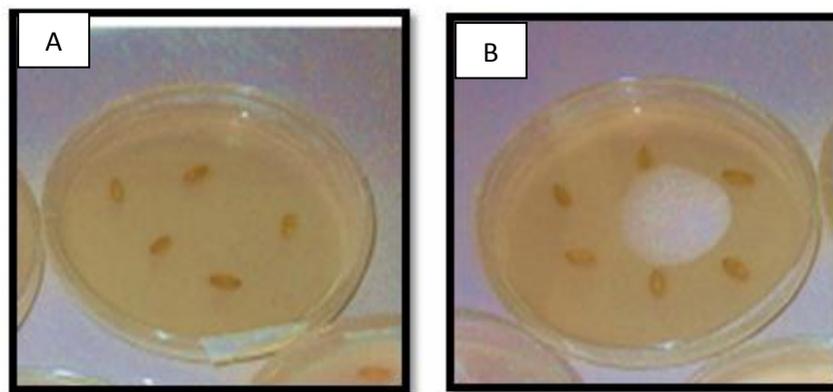


Figure 03 : Ensemencement des grains de blé sur PDA

(A) Blé traité, (B) Blé non traité

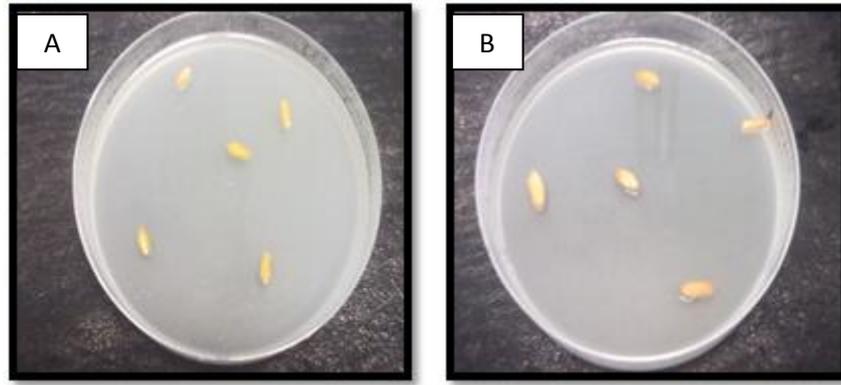


Figure 04 : Ensemencement des grains de blé sur CEA

(A) Blé traité, (B) Blé non traité

1.3.2. Méthode indirecte

La méthode de dilution (ou méthode indirecte) consiste à dénombrer les microorganismes des grains de blé. De chaque échantillon, 5g de grains broyés ont été additionnés à 45ml d'eau physiologique, ce qui correspond à la solution mère. A partir de la dilution mère, des dilutions décimales ont été réalisées pour chaque échantillon de blé. Deux boîtes pour chaque dilution ont été ensemencées avec 0.1 ml d'inoculum étalé en surface. L'incubation a été faite à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 5 à 7 jours. Trois milieux ont été couramment utilisés PDA, DRBC et CEA (Figure 05). Le développement bactérien a été inhibé par l'adjonction d'antibiotiques (Amoxicilline). (Gacem, 2011)

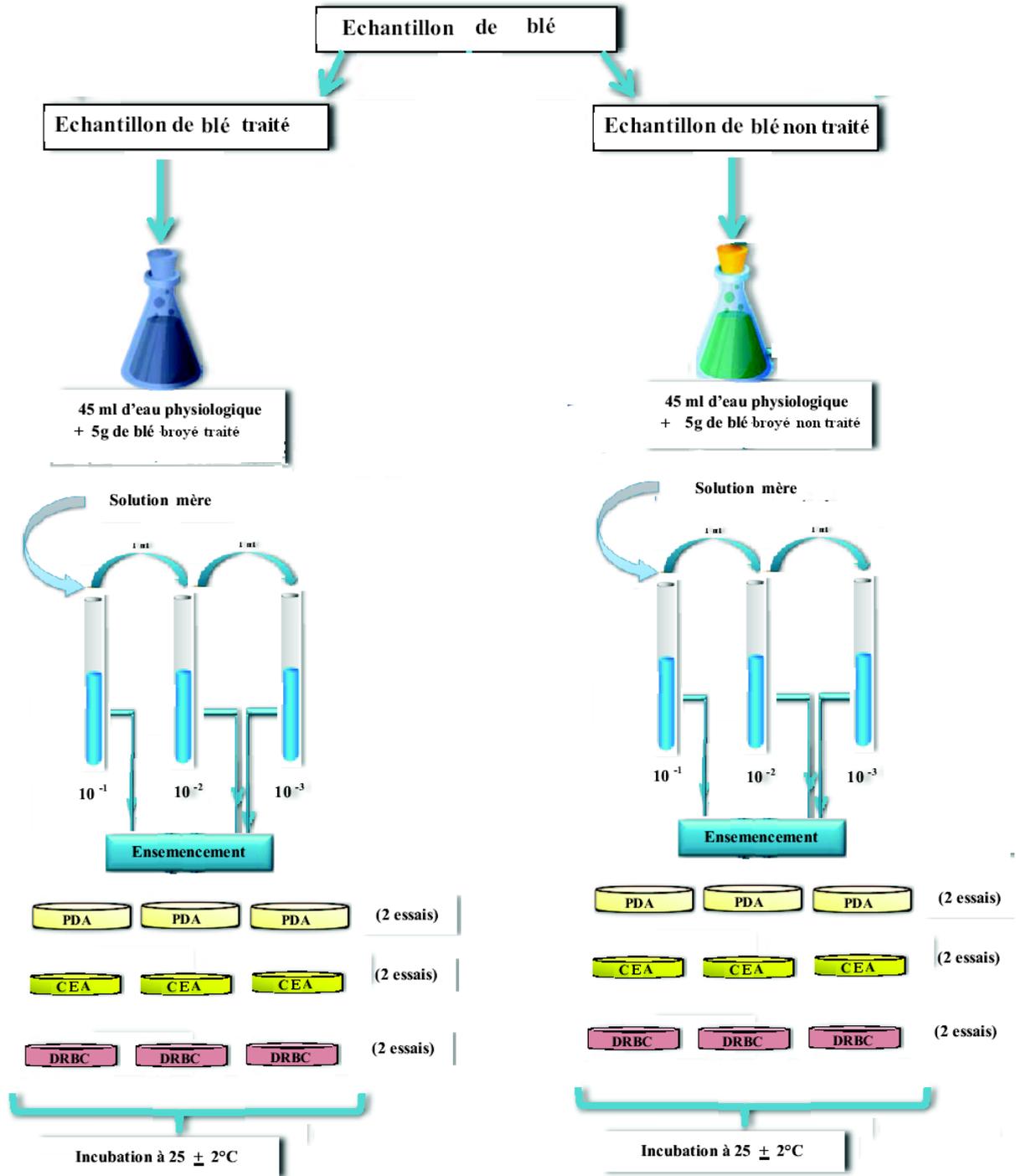


Figure 05 : Techniques d'isolement et de dénombrement des souches fongiques isolées à partir des grains de blé par la méthode indirecte

1.3.3. Méthode de filter paper soaked (SFP:filter paper soaked with NaCl solution)

Cinq (5) grains de blé sélectionnés au hasard de chaque échantillon ont été mises dans 5 boîtes de Pétri stériles contenant du papier filtre stérile, imbibé avec l'eau physiologique stérile (Mills *et al.*,1978) (Figure 06) .Les boîtes ainsi préparées ont été incubées à 25°C à l'obscurité pendant 10 à 15 jours.

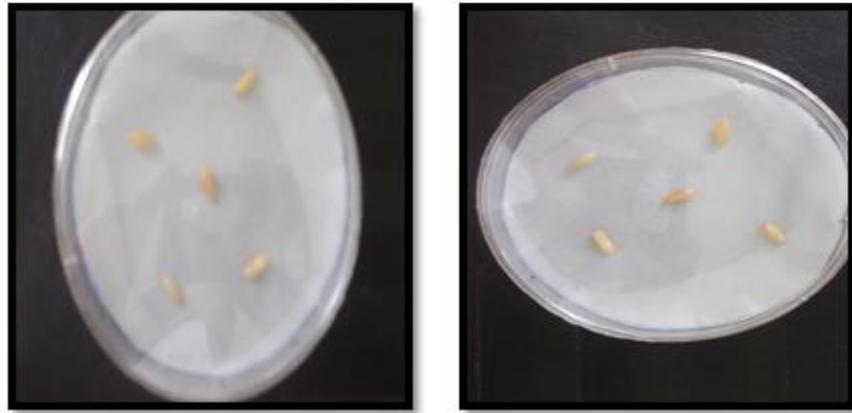


Figure 06 : Isolement par la méthode de filter paper soaked

1.4. Purification des isolats

Des observations quotidiennes ont été effectuées dès la germination des grains et l'apparition de mycélium. Chaque mycélium développé a été repiqué, à l'aide d'un fil de platine stérile, au centre de boîte de Pétri contenant un milieu PDA, puis incubé à 28±4°C pendant 6 jours.

En cas de contamination par une autre souche fongique, la purification des souches a été effectuée par le repiquage d'un hyphes terminal au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (Guiraud, 2003).

1.5. Identification des isolats

L'identification des champignons contaminants les grains de blé repose sur :

1.5.1. Etude des caractères cultureux

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques a porté sur tous les groupes de moisissures isolées. Les caractères étudiés sont:

- Au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle, la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie et la vitesse de croissance apicale (Djossou, 2011)
- Au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible et les exsudats. (Djossou, 2011).

1.5.2. Etude des caractères morphologiques microscopiques

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (Absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores,..) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes, etc..) (BOTTON *et al.*, 1990).

2. Etude mycotoxique

2.1. Détection des mycotoxines au niveau du substrat

50 g de chaque échantillon de blé dur traité et non traité finement broyé ont été additionnés à 100 ml d'un mélange de solvants (chloroforme – méthanol V/V). Le mélange a été agité pendant 10 min et la phase liquide a été séparée du culot par filtration. Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant au liquide récupéré à chaque fois après filtration (Figure 07).

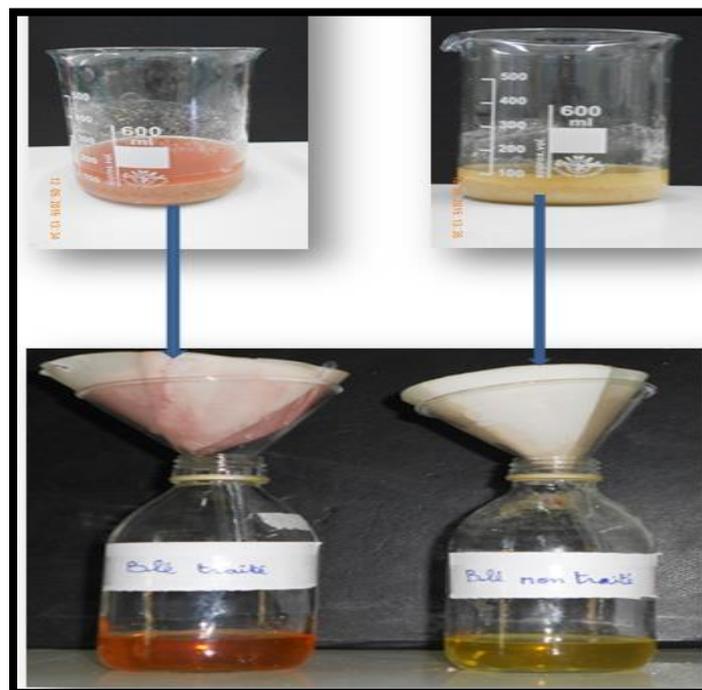


Figure 07 : Détection des mycotoxines au niveau du substrat

Le filtrat a été ensuite concentré jusqu'à un volume de 2 à 3 ml par évaporation au rotavapor. L'extrait obtenu a été étalé sur un gel d'agar à 2 % et à pH 7 coulé préalablement sur boîtes de pétri puis solidifié. Les boîtes ont été laissées entrouvertes afin de permettre l'évaporation du solvant d'extraction, puis elles ont été gardées à 4°C pendant 24 heures.

Après la diffusion des mycotoxines à l'intérieur de la gélose, la surface a été essuyée à plusieurs reprises avec du papier filtre imbibé d'hexane pour éliminer les macromolécules de la matière organique. Le gel d'Agar a été ensuite découpé en petits carreaux et mélangé avec 100 ml de chloroforme. Le tout a été agité pendant 10 minutes puis filtré.

Le liquide obtenu a été ensuite additionné à 50 et 30 ml de chloroforme et agité à chaque fois qu'il est récupéré après filtration. Les filtrats obtenus ont été également mélangés puis concentrés à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml (Zuber *et al.*, 1987). La figure 08 résume les différentes étapes d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide.

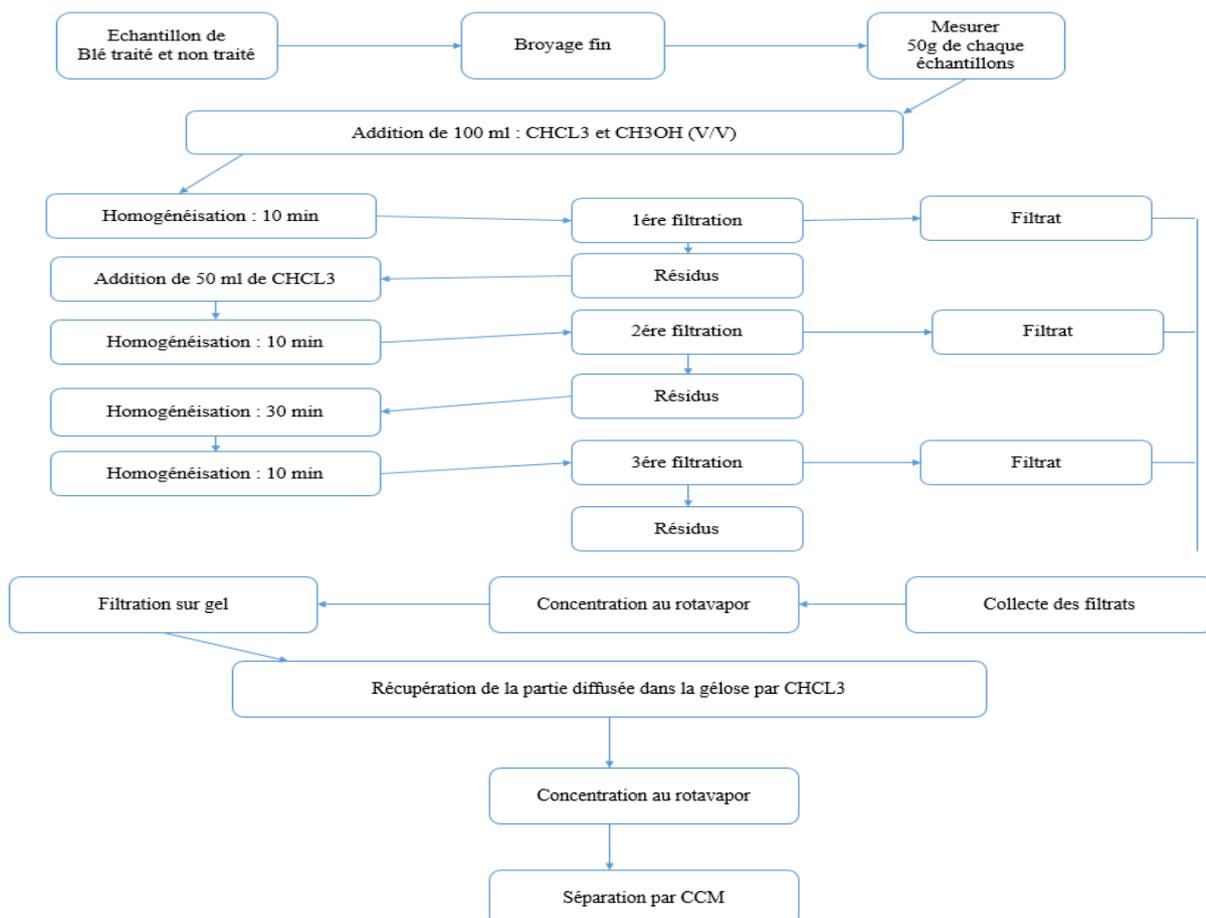


Figure 08. Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide (Zuber *et al.*, 1987).

2.2. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation

La production des métabolites secondaires (mycotoxines) par les souches isolées a été mise en évidence par une extraction et purification à partir d'une culture de fermentation, suivie par la détection qualitative de ces mycotoxine par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

2.2.1 Préparation du milieu de fermentation

Le milieu Czapeck dox liquide (CYA) additionné de 2.5% extrait de levure a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des mycotoxines (Rojas *et al.*, 2005, Pamel *et al.*, 2010).

La fermentation a été réalisée dans des erlen meyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture (Czapeck dox liquide) et le pH a été ajusté à 5,5 (Tuomi *et al.*, 2001).

2.2.3. Ensemencement du milieu de fermentation

Les souches sélectionnées comme résistantes (détectées dans les deux échantillons) ont été ensemencées en surface dans des erlen meyer de 250 ml contenant 30 ml de PDA gélosé. Après 10 jours d'incubation à 25°C, les souches étudiées sporulent et leur spores ont été récupérées par l'ajout de 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique (Rabie *et al.*, 1977). Les suspensions sporale obtenues ont été diluées avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, la concentration en spores/ml des solutions obtenues a été déterminée à l'aide d'une cellule de Thomas. Des dilutions décimales ont été effectuées pour obtenir une suspension sporale à 10^6 spore/ml (Klich *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2003; Ehrlich *et al.*, 2005).

Chaque erlen meyer contenant le milieu de culture a été inoculé par 1 ml de la suspension sporale (10^6 spore/ml). Les erlen meyer ont été incubés en statique à 28°C, pendant 14 jours et à l'obscurité (Chung *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1994 ; Klich *et al.*, 2001).

2.2.4. Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu CYA à travers du papier filtre type Wattman N° 01 (Figure 09 A).

Les 50 ml du filtrat obtenu ont été additionnés à 100 ml de chloroforme, le mélange a été rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation (Figure 09 B). Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.

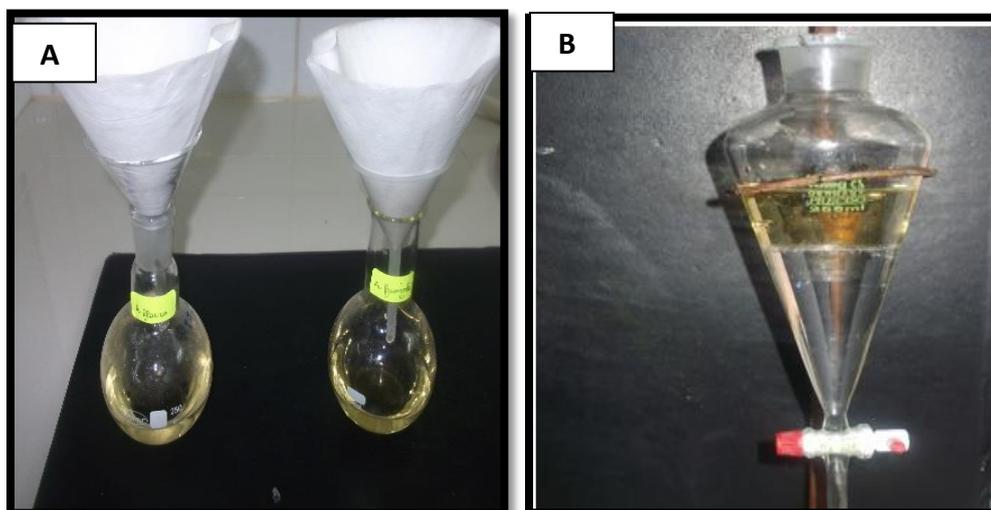


Figure 09 : Extraction des métabolites secondaires

(A) Filtration du milieu de fermentation, (B) Décantation

La phase chloroformique a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 45 °C (Figure 10). Une fois sec, l'extrait a été remis en suspension dans 500µl de methanol et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieurs par CCM et HPLC (Gengan *et al.*, 1999).



Figure 10: Evaporation sous vide a l'aide d'un rotavapeur

2.3. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle a été faite sur une plaque de silicagel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de 20 μ l et un autre de 40 μ l de chaque extrait chloroformique concentré. La plaque a été ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'élution constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (40/32/8 v/v/v) respectivement (figure 11) (Multon, 1982).

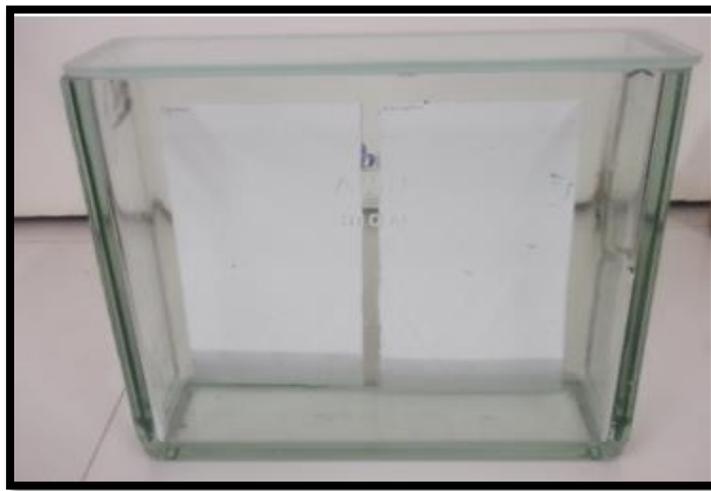


Figure 11 : Préparation de la plaque CCM

Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque a été examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques.

2.4. Détection des mycotoxines par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Le système chromatographique utilisé au laboratoire se compose d'un système de pompage avec un formeur de gradient, une colonne et d'un injecteur (Pump.Agilent G 1312A binary, C₁₈ column). Les différents éléments sont reliés à un micro-ordinateur permet de piloter automatiquement les différents composants du système chromatographique. Il présente aussi toutes les fonctions d'un intégrateur classique de chromatographie . L'appareil HPLC (jasco UV-2075 plus) permet une détection et séparation des quatre mycotoxines par UV à

$\lambda=253\text{nm}$. Le système a été équipé également un logiciel (ChromNAV) permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données (Gengan *et al.*, 1999). (Figure 12)

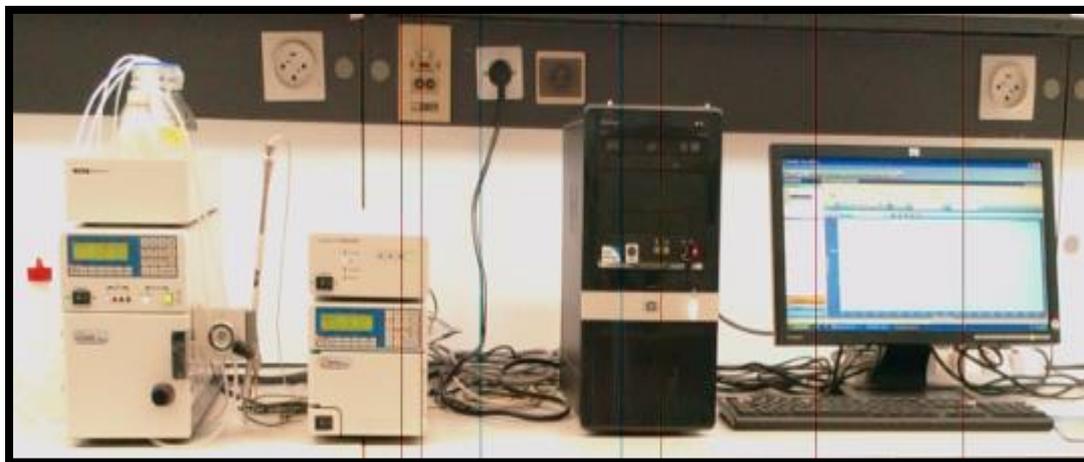


Figure 12 : Système HPLC (Laboratoire technique FACS NV université frères mentouri)

Un système de gradient de solvant, inspiré a été développé afin d'établir des profils de métabolites secondaires des souches utilisées. La phase mobile est composée de deux solvants : le solvant A (Eau) et le solvant B (acétonitrile). Au temps $t = 0$, la part du solvant B représente 10% de la phase mobile pour augmenter de façon linéaire pendant 30 minutes afin d'atteindre 50%, puis 90% de la phase mobile en 34 minutes. Enfin, les conditions initiales du système chromatographique sont rétablies en deux minutes supplémentaires afin de rincer et de rééquilibrer la colonne (Tableau 06). Une colonne C18 Zorbax C18 a été utilisée comme phase stationnaire. 20 μl d'extrait resuspendu et filtré sont injectés automatiquement dans le système de chromatographie, pour chaque échantillon considéré avec un débit de 2ml/min.

Tableau 06: Programme gradient utilisé pour l'analyse et la séparation du métabolite (Gengan *et al.*, 1999).

Temps (min)/Solvant	A	B
0 min	90%	10%
30 min	50%	50%
34 min	10%	90%
36 min	90%	10%

3. Approche a la lutte biologique contre les moisissures mycotoxinogènes isolées

3.1. Recherche des agents antagonistes aux champignons pathogènes des grains de blé

Les analyses mycologiques des grains de blé (traités et non traités) ont permis de mettre en évidence au laboratoire, la présence d'agents antagonistes aux agents pathogènes des grains pouvant inhiber ou limiter la croissance de ces champignons pathogènes. Après isolement de ces champignons, nous avons procédé à des tests ayant pour but de connaître leurs effets sur le développement de ces agents pathogènes. Parmi les isolats pathogènes nous avons testé les souches les plus résistantes qui ont été isolées dans les deux échantillons de blé (traité et non traité).

3.2. Test d'antagonisme par confrontation directe

Cette méthode appelée encore (confrontation équidistante), les confrontations in vitro ont été effectuées selon, la méthode de Patel et Brown (1969), elle consiste à déposer dans la même boîte de pétri contenant 15 ml de milieu PDA deux pastilles gélosées (6mm de diamètre), l'une portant les souches antagonistes testées et l'autre les souches pathogènes (figure 13).

Le témoin est présenté par des boîtes de Pétri contenant uniquement le champignon pathogène.

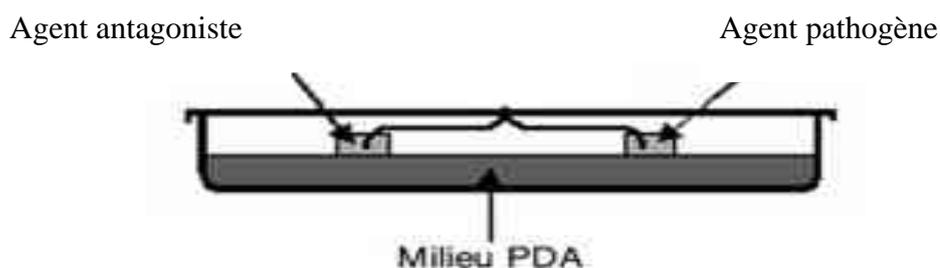


Figure 13: Confrontation entre l'isolat pathogène et une souche antagoniste par contact direct sur milieu PDA.

3.3. Mesure de la croissance mycélienne

Les mesures de la croissance mycélienne ont été prises quotidiennement et le test s'achève lorsque l'une des colonies aura couvert l'ensemble de la boîte. Pour l'estimation de la croissance mycélienne, la technique utilisée est celle indiquée par Rapily (1968) qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies de pathogène.

La croissance mycélienne des champignons pathogènes testés a été évaluée tous les jours en mesurant sur le diamètre de la boîte de Pétri, le rayon du parasite du côté de l'antagoniste. Cette évaluation a été faite toutes les 24 heures et pendant 7 jours. Après cette période les notations ont été faites en mesurant la largeur de la zone d'inhibition observée entre les deux colonies.

L'évaluation de l'inhibition exercée par l'antagoniste est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmoun *et al.*, 1996) :

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

Où

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

C_o : le diamètre moyen des colonies témoins.

3.4. Evaluation de la sporulation

L'évaluation de la sporulation est effectuée selon le principe de la méthode utilisée par Maslouhy (1989). Pour chaque boîte la sporulation a été évaluée au 12^{ème} jour. A l'aide d'un emporte pièce désinfecté, 10 rondelles ont été prélevées (6 mm de diamètre) sur la périphérie des colonies d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* du côté de l'antagoniste. Ces rondelles ont été ensuite mises dans 10 ml d'une solution d'acide acétique. Le chauffage (45 à 50 °C) pendant quelques minutes permet de libérer les conidies. La concentration exprimée en nombres de spores par ml a été estimée à l'aide de la cellule de Thoma. Dans le cas des témoins les estimations ont été effectuées de la même façon en prélevant des rondelles à la périphérie des colonies d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ensemencé seul.

Résultats

1. Etude mycologique des grains de blé (traités et non traités)

1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons de blé

Sur les deux échantillons analysés (Blé traité et non traité) nous avons isolé 25 souches fongiques. En effet, nous avons obtenu 09 isolats fongiques à partir des grains de blé traités et 16 isolats fongiques pathogènes à partir des grains non traités. (Tableau 07).

Tableau 07 : Les différents genres fongiques obtenus à partir de blé traité et non traité

	Nombres d'isolats	Genres et /ou espèces	Pourcentage
Blé traité	09	<i>Aspergillus flavus</i> (1)	44,44%
		<i>Aspergillus flavus</i> (2)	
		<i>Aspergillus flavus</i> (3)	
		<i>Aspergillus flavus</i> (4)	
		<i>Aspergillus niger</i> (1)	22,22%
		<i>Aspergillus niger</i> (2)	
Blé non traité	16	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11,11%
		<i>Trichoderma sp</i>	11,11%
		<i>Penicillium sp</i>	11,11%
		<i>Aspergillus flavus</i> (1)	25%
		<i>Aspergillus flavus</i> (2)	
		<i>Aspergillus flavus</i> (3)	
		<i>Aspergillus flavus</i> (4)	
		<i>Aspergillus niger</i> (1)	12,25%
		<i>Aspergillus niger</i> (2)	
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,25%
<i>Penicillium sp1</i>	18,75%		
<i>Penicillium sp2</i>			
<i>Penicillium sp 3</i>			
<i>Cladosporium sp</i>	6,25%		
<i>Rhizopus sp</i>	6,25%		
<i>Alternaria sp1</i>	12,25%		

		<i>Alternaria sp2</i>	
		<i>Ulocladium sp</i>	6,25%
		<i>Trichoderma sp</i>	6,25%

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les deux échantillons de blé analysés sont contaminés par les moisissures.

L'utilisation du milieu PDA a permis de révéler 16 souches fongiques dans les deux échantillons de blé dur à des taux différents. Le genre le plus prédominant est l'*Aspergillus*. Le pourcentage de contamination par les *Aspergillus* dans le blé dur traité est plus important, il est de 80%, par contre, le pourcentage de contamination par le même genre dans le blé dur non traité est de 36.36%. Le pourcentage de contamination par *Trichoderma* dans les deux échantillons (blé dur traité et non traité) est respectivement de 20% et 9.09% (Figure 14).

Les *Aspergillus* contaminants les grains de blé dur traités sont représentés essentiellement par *Aspergillus flavus* avec un pourcentage de contamination de 40% et *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger* avec un pourcentage de contamination de 20%. Le blé dur non traité est surtout contaminée par *Aspergillus flavus* avec un pourcentage de contamination de 18.18% , *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger* avec un pourcentage de contamination de 9.09%. Le pourcentage de contamination par les genres *Penicillium* et *Alternaria* est de 18.18%.

Les genres *Cladosporium* et *Ulocladium* révélés sur les grains de blé dur non traité appartiennent à la flore du champ et la flore intermédiaire.

Il ressort aussi que la mycoflore totale du blé dur non traité est plus élevée que celle du blé dur traité. Elle est respectivement de 68.75% et 31.25% .

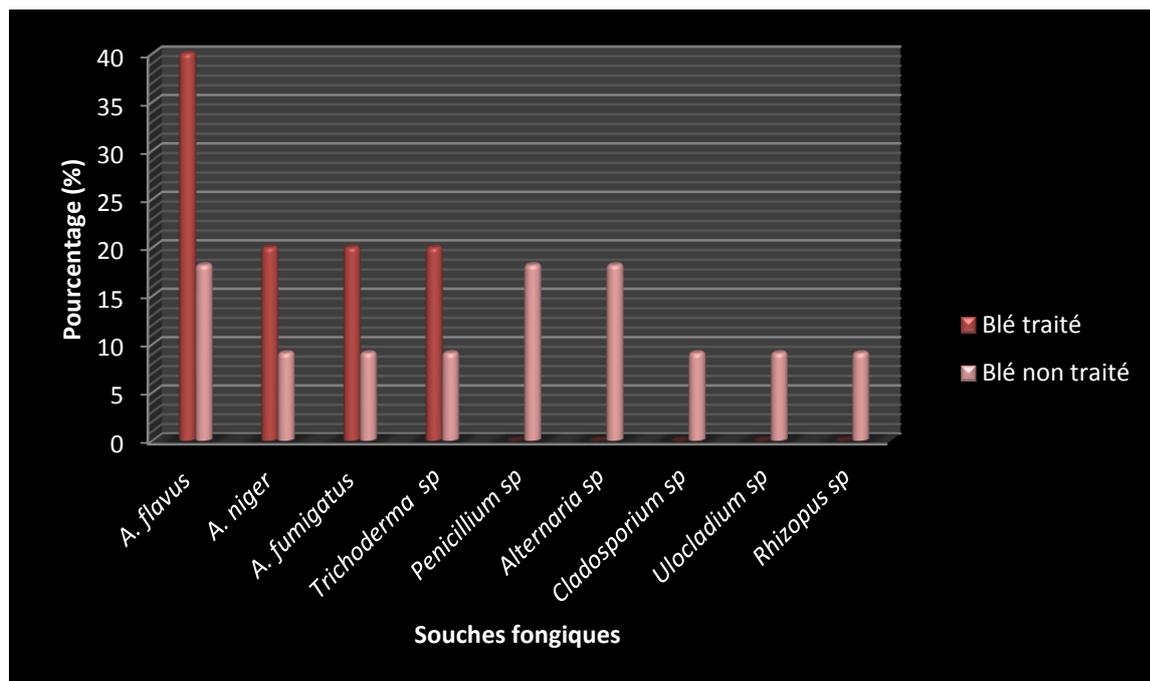


Figure 14 : La flore fongique isolée sur le milieu PDA à partir du blé traité et non traité

Par contre sur le milieu Rose bengal il ya uniquement la présence du genre *Penicillium* dans les deux échantillons de blé dur traité et non traité avec un pourcentage de contamination de 100% (Figure 15).

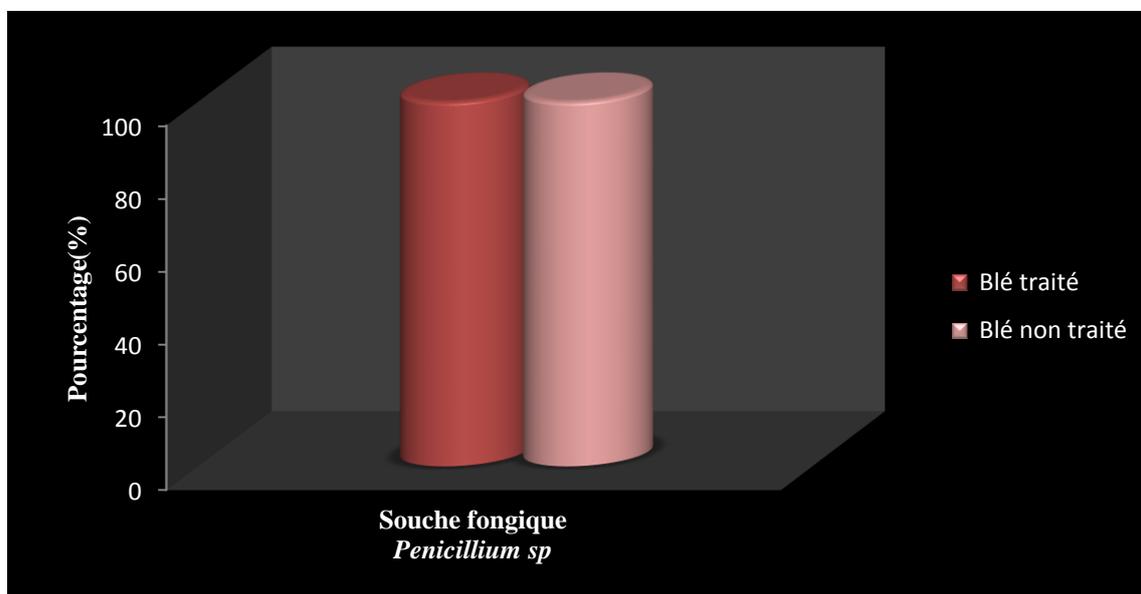


Figure 15: La flore fongique isolée sur le milieu RB à partir du blé traité et non traité

Sur le milieu CEA le genre le plus dominants est *Aspergillus* dans les deux échantillons de blé dur. le pourcentage de contamination par les *Aspergillus* dans le blé dur traité est de 100% et dans le blé dur non traité est de 66,66% . Les *Aspergillus* contaminants les grains de blé dur traités sont représentés essentiellement par *Aspergillus flavus* ,et *Aspergillus niger* avec un pourcentage de 50% et le blé dur non traité est surtout contaminée par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* avec un pourcentage de contamination de 33,33% .et il est contaminé aussi par le genre *Rhizopus* avec un pourcentage de 33,33% (Figure 16)

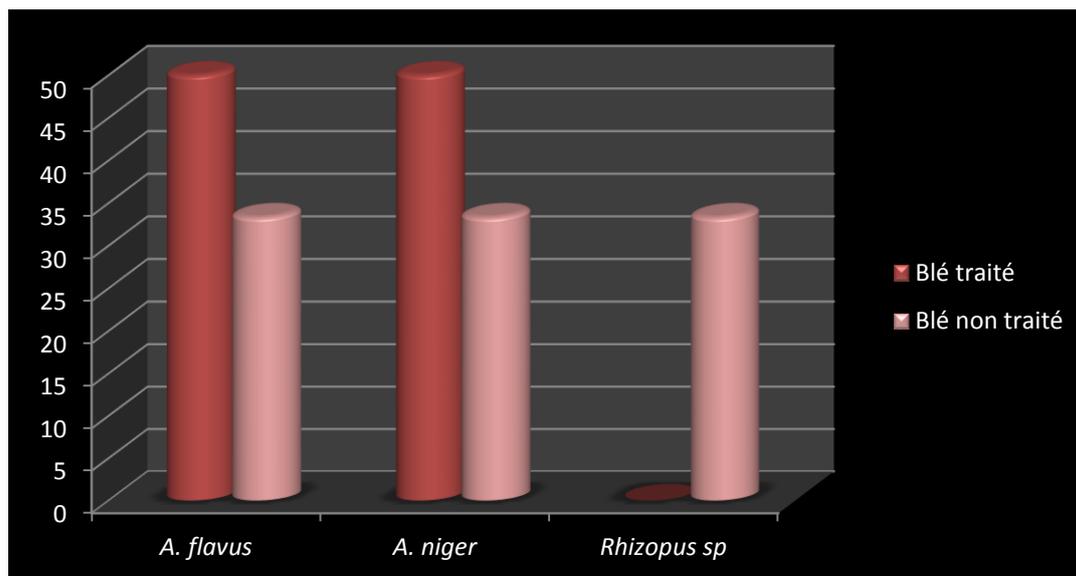


Figure 16 : La flore fongique isolée sur le milieu CEA à partir du blé traité et non traité

Ces isolats ont été identifiés sur la base des caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et la texture de la colonie, ainsi que les structures micro morphologiques permettent généralement de faire la distinction entre ces genres.

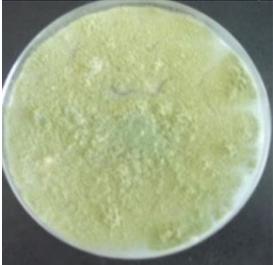
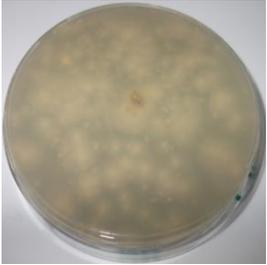
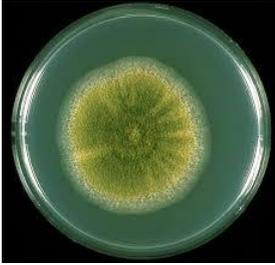
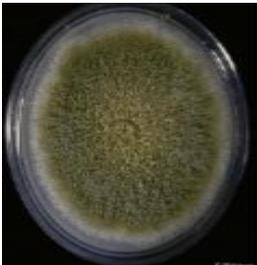
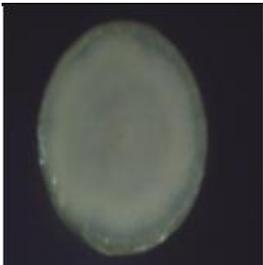
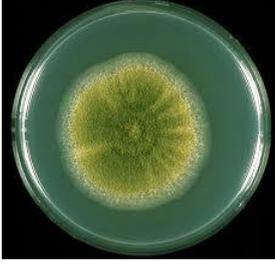
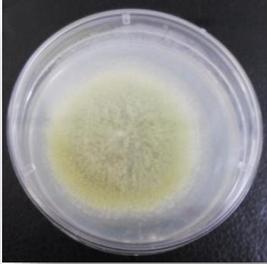
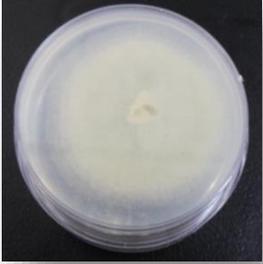
1.2. Identification des souches fongiques isolées

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Botton (1990); Guiraud (1998) ; Leyral *et al*, (1998) ainsi que celles de Chabasse *et al*, (2002).

1.2.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation, à l'œil nu, des caractères culturaux (aspect de la colonie, couleur, revers, et la vitesse de la croissance). Les résultats obtenus, ont été rassemblés dans les tableaux (08 et 09) ci-dessous.

Tableau 08 : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé traités

Aspect macroscopique des isolats		Aspect macroscopique	Référence (Chabasse <i>et al.</i> ,2002)
Surface	Revers		
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	

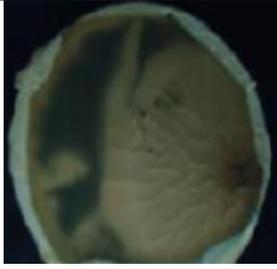
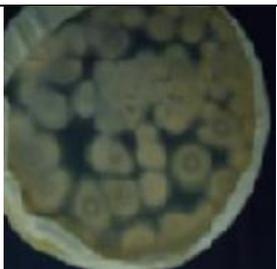
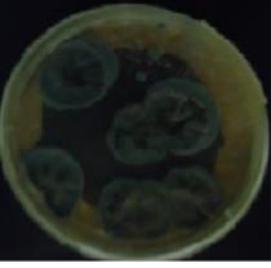
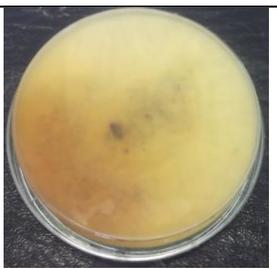
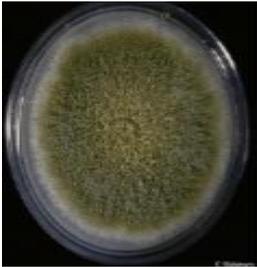
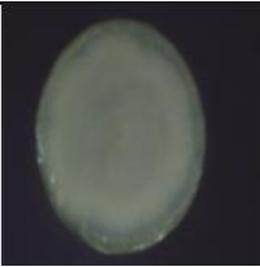
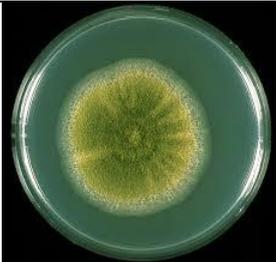
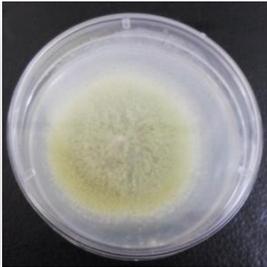
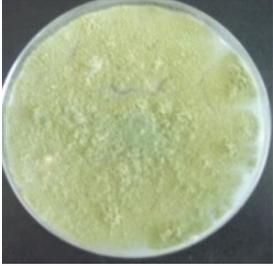
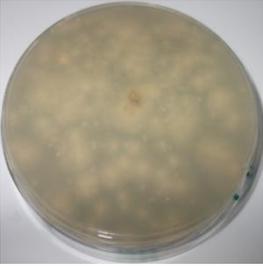
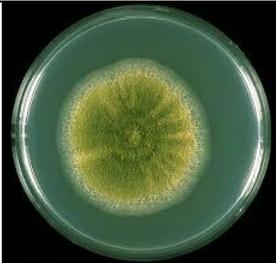
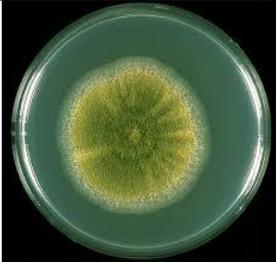
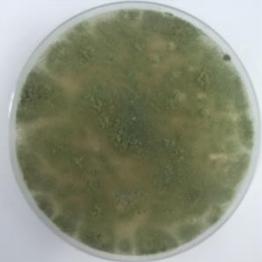
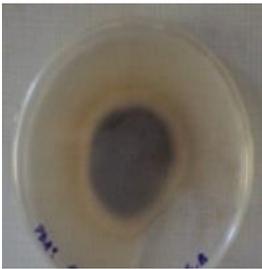
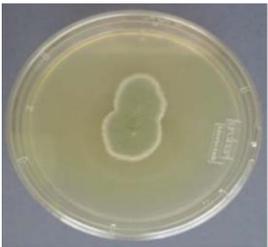
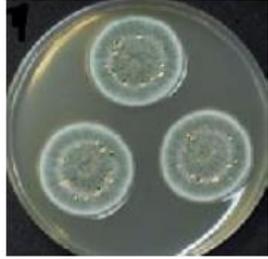
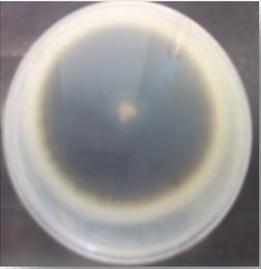
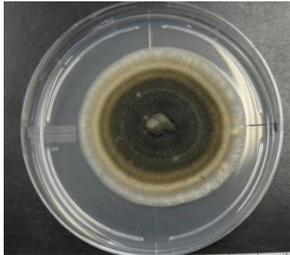
		<p>Colonie à croissance rapide sur milieu de PDA</p> <p>Texture poudreuse, de couleur noire</p> <p>Verso : incolore</p>	
		<p>Colonie à croissance rapide sur milieu de PDA</p> <p>Texture poudreuse, de couleur noire</p> <p>Verso : incolore</p>	
		<p>Texture : duverteuse à poudreuse.</p> <p>Couleur : blanche puis bleu-vert, virant en suite au vert foncé à gris noirâtre</p> <p>Vitesse de croissance très rapide.</p>	
		<p>-Recto : colonie verte bleuâtre, velouté</p> <p>-Verso : marron jaunâtre</p> <p>colonie à croissance moyenne</p>	
		<p>couleur verte</p> <p>vitesse de croissance rapide .</p>	

Tableau 09 : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains du blé non traités

Aspect macroscopique des isolats		Aspect macroscopique	Référence (Chabasse <i>et al.</i> ,2002)
Surface	Revers		
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	
		Recto :colonie duveteus à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	
		Recto :colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaune,puis vert-jaune Verso :brun colonie à croissance rapide	

		<p>Colonie à croissance rapide sur milieu de PDA</p> <p>Texture poudreuse, de couleur noire</p> <p>Verso : incolore</p>	
		<p>Colonie à croissance rapide sur milieu de PDA</p> <p>Texture poudreuse, de couleur noire</p> <p>Verso : incolore</p>	
		<p>Texture : duverteuse à poudreuse.</p> <p>Couleur : blanche puis bleu-vert, virant en suite au vert foncé à gris noirâtre</p> <p>Vitesse de croissance très rapide.</p>	
		<p>Thalle d'abord lisse puis plus ou moins floconneux, zoné couleur verte</p> <p>vitesse de croissance rapide .</p>	
		<p>Recto : colonie blanche, velouté granuleuse marron .</p> <p>Verso : beige colonie à croissance moyenne</p>	

		<p>Recto : colonie duveteuse à poudreuses,d'abord blanches,puis jaunes,puis vert- jaune Verso : brun colonie à croissance rapide</p>	
		<p>Recto : colonie duveteuse à poudreuse,d'abord blanche,puis jaunes,puis vert- jaune Verso : brun colonie à croissance rapide</p>	
		<p>Colonie poudreuse à laineuses, vert foncé à noir</p>	
		<p>Colonie poudreuse à laineuses, vert foncé à noir</p>	

		Croissance modérément rapide sur le milieu PDA Recto : couleur vert olive Verso : brun noir	
		Croissance rapide Texture laineuse couleur blanc Verso : incolore	
		Croissance assez lente Colonie duveteuse à poudreuse Couleur brun olive à noir	

1.2.2. Identification microscopique

Toutes les moisissures isolées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100. Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans les tableaux (10 et 11) ci-dessous.

- 14 souches présentent les caractéristiques suivantes :
 - ✓ Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule ;
 - ✓ Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules

- ✓ Têtes conidiennes unisériées ou bisériées
- ✓ Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires.

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

- 04 souches caractérisées par:
 - ✓ Mycélium cloisonné ;
 - ✓ Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ;
 - ✓ Penicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium*

- 02 souches caractérisées par :
 - ✓ Des conidies unicellulaires globuleuses
 - ✓ Des phialides en forme de quille, en verticilles sur des conidiophores ramifiés à angle droit ou sur leurs branches latérales.

Ces critères rejoignent ceux du genre *Trichoderma*

- 02 souches présentent les caractères suivants :
 - ✓ Filaments septés, fin et régulier bruns foncé à noirs.
 - ✓ Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.

Ces souches semblent appartenir au genre *Alternaria*

- 01 souche a les caractéristiques suivantes :
 - ✓ Des conidiophores ramifiés et allongés.
 - ✓ Des conidies en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes

Cette souche appartient probablement au genre *Cladosporium*

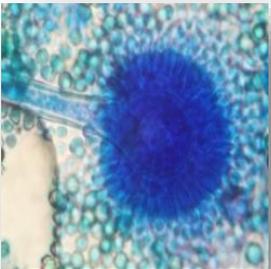
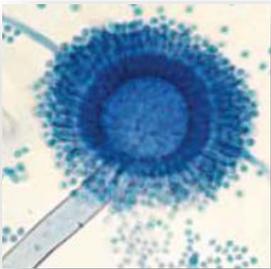
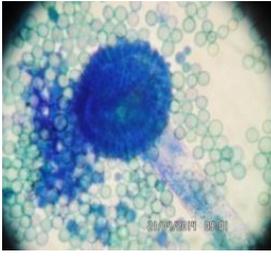
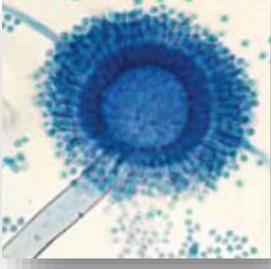
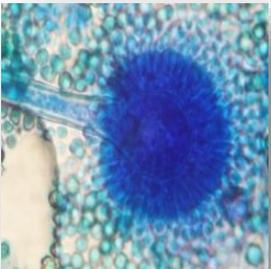
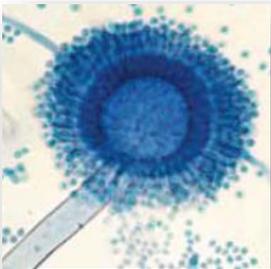
- 01 souche a les caractéristiques suivantes :
 - ✓ Sporosystophores généralement très grands, terminés en entonnoir, en bouquet de 2 à 6 présentant à la base de rhizoïdes ;
 - ✓ Columelles brunes, globuleuses ou semi globuleuses.

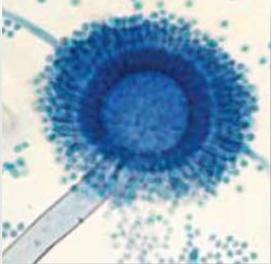
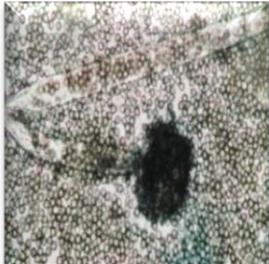
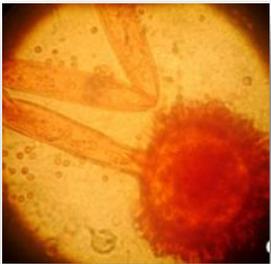
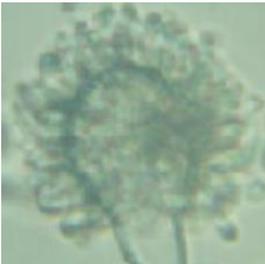
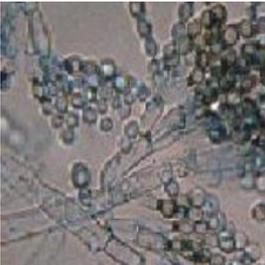
Cette souche appartient probablement au genre *Rhizopus*

- 01 souche a les caractéristiques suivantes :
 - ✓ Filaments septés, fin et régulier
 - ✓ Des conidies rondes et globuleuses portent plusieurs striations

Cette souche appartient probablement au genre *Ulocladium*

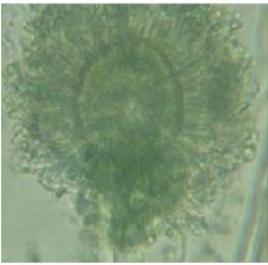
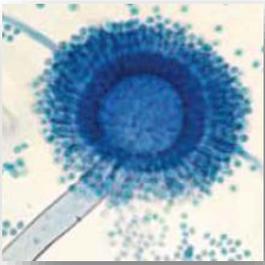
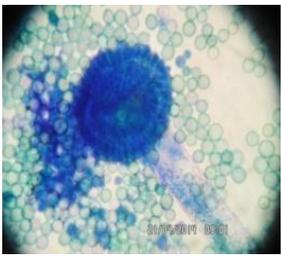
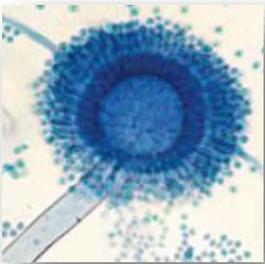
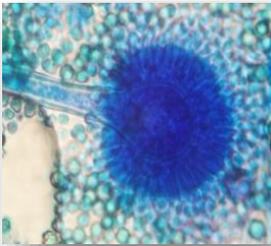
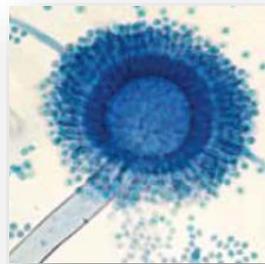
Tableau10 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé traités

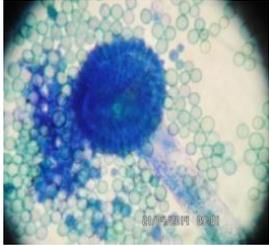
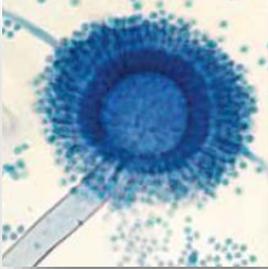
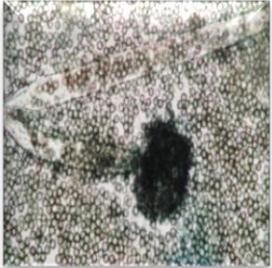
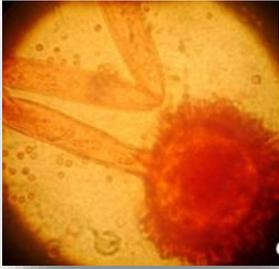
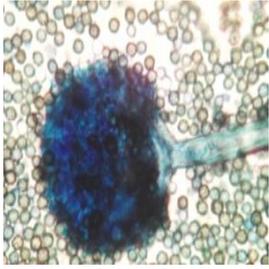
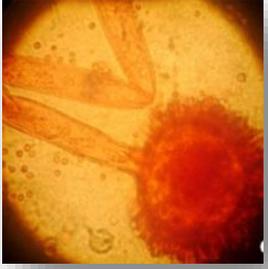
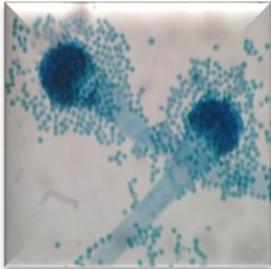
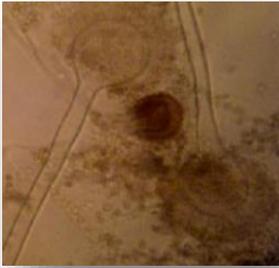
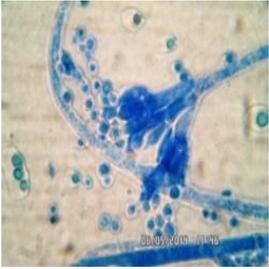
Aspect microscopique X100	Photo Microscopique de Référence (Chabasse <i>et al.</i> ,2002)	Identification de la souche
		<i>Aspergillus flavus</i>
		<i>Aspergillus flavus</i>
		<i>Aspergillus flavus</i>

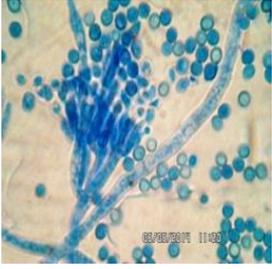
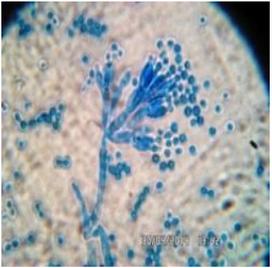
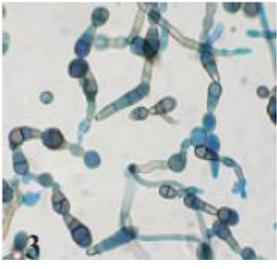
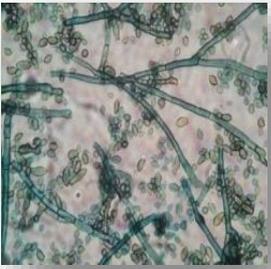
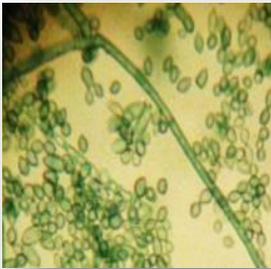
		<p><i>Aspergillus flavus</i></p>
		<p><i>Aspergillus niger</i></p>
		<p><i>Aspergillus niger</i></p>
		<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
		<p><i>Penicillium sp1</i></p>

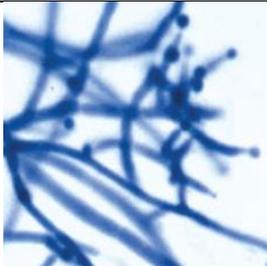
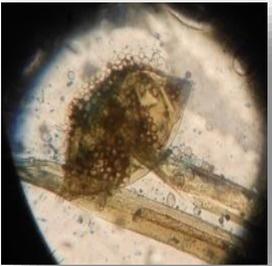
		<p><i>Trichoderma sp1</i></p>
---	---	-------------------------------

Tableau 11 : Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé non traités

Aspect Microscopique obtenus (x100)	Photo Microscopique de Référence (Chabasse <i>et al.</i> ,2002)	Espèce obtenue
		<p><i>Aspergillus flavus</i></p>
		<p><i>Aspergillus flavus</i></p>
		<p><i>Aspergillus flavus</i></p>

		<p><i>Aspergillus flavus</i></p>
		<p><i>Aspergillus niger</i></p>
		<p><i>Aspergillus niger</i></p>
		<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
		<p><i>Penicillium sp2</i></p>

		<p><i>Penicillium sp3</i></p>
		<p><i>Penicillium sp4</i></p>
		<p><i>Alternaria sp1</i></p>
		<p><i>Alternaria sp2</i></p>
		<p><i>Cladosporium sp</i></p>

		<i>Trichoderma sp2</i>
		<i>Rhizopus sp</i>
		<i>Ulocladium sp</i>

2. Etude mycotoxique

2.1. Révélation des mycotoxines au niveau des substrats

D'après les résultats de la détection des mycotoxines au niveau des grains de blé, nous constatons l'absence de spots fluorescents. Les deux échantillons du blé traité et non traité sont dépourvus des mycotoxines recherchées.

2.2. Analyse des mycotoxines par CCM

Pendant les 14 jours d'incubation, les Erlens ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques.

L'extraction des métabolites secondaires d'*A. flavus*, d'*A. fumigatus* et d'*A. niger* a été réalisée par les solvants organiques, leur séparation a été faite sur la chromatographie sur couche mince (CCM) avec une révélation par radiation des UV à une $\lambda = 365$ nm et sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La chromatographie sur couche mince de l'extrait d'*Aspergillus niger* a permis de séparer plusieurs spots, apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV. Les spots correspondant à l'ochratoxine A donnent une fluorescence bleu vert et un $R_f=0,52$ (Figure 17)

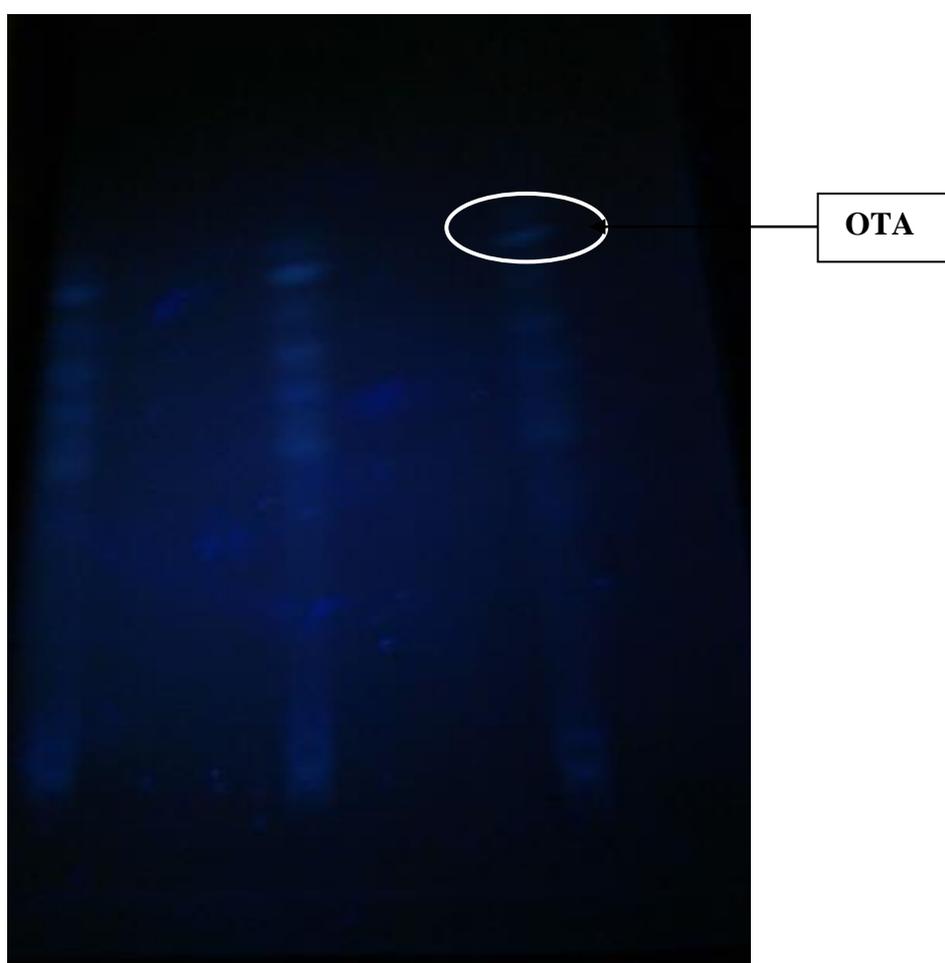


Figure 17: Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par A : *A.niger*,

La fluorescence bleue détectée par l'UV et un R_f de l'ordre de 0,67 sont deux paramètres qui indiquent la production de l'aflatoxine B1 par l'espèce *A.flavus* (Figure 18).

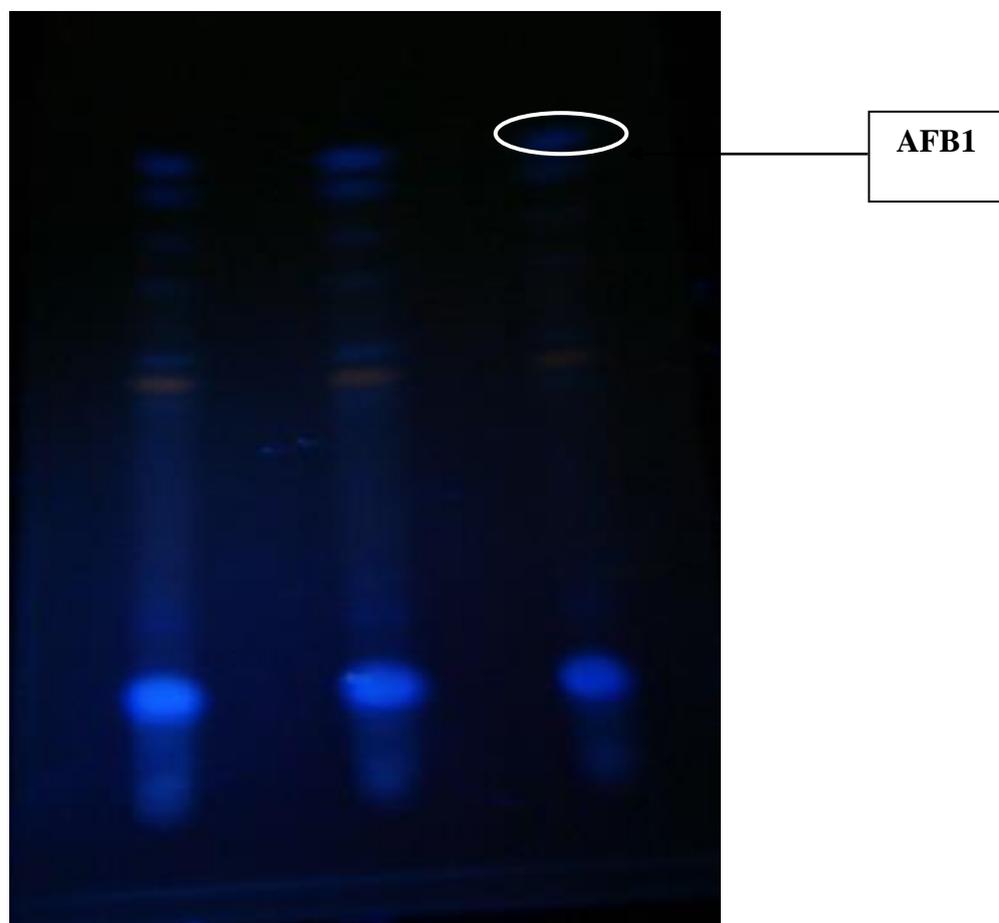


Figure 18: Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *A.flavus*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus fumigatus* contient 10 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 19). Selon la couleur fluorescente des spots et le R_f , trois composants ont été identifiés. La gliotoxine caractérisée par une fluorescence bleue et un $R_f = 0,45$, la verrucogène et la fumagilline qui donnent une fluorescence verte et des $R_f = 0,50$ et $0,62$ respectivement.

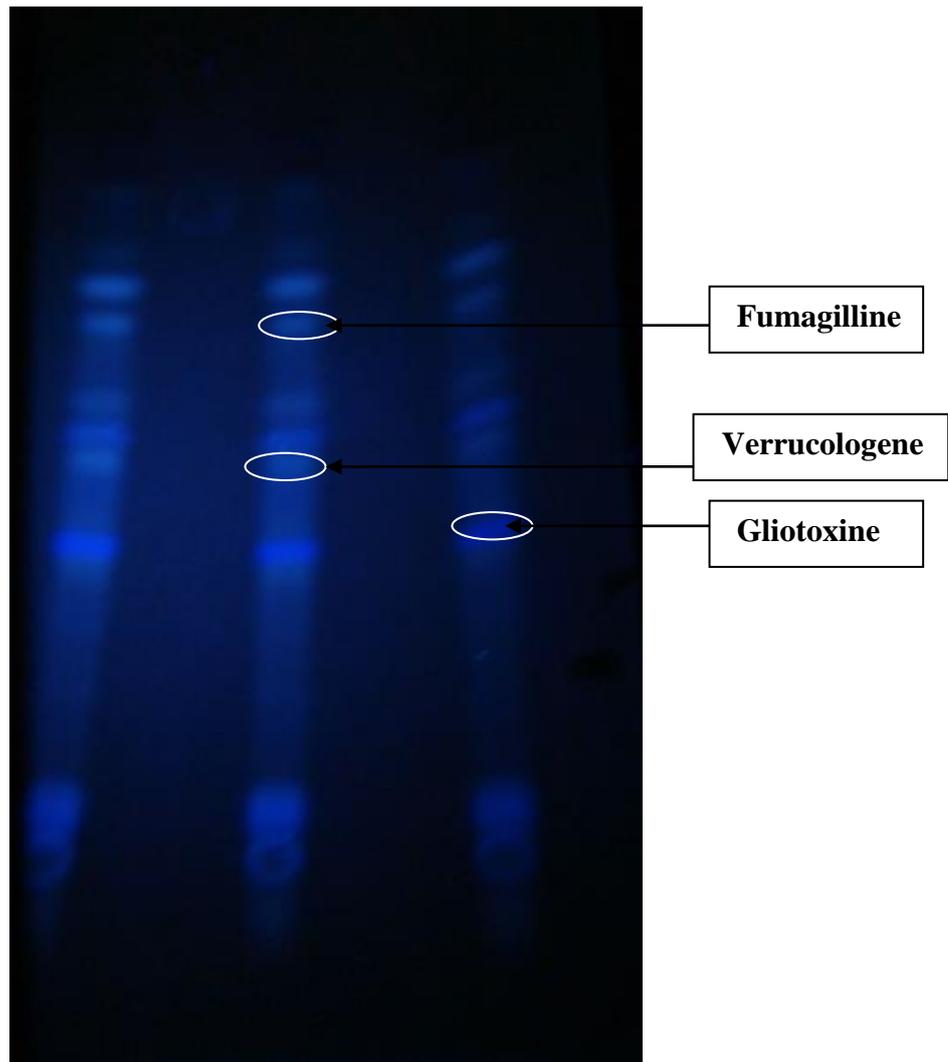


Figure 19: Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *A.fumigatus* .

Les valeurs de coefficient R_f (rapport frontal) obtenus sont approximativement proches (Tableau 12).

Tableau 12 : Les valeurs R_f des spots séparées par la CCM

Les souches	Numéro des taches	Couleur des taches sous		Rapport frontal R_f
		Lumière visible	Longueur d'onde 365 nm	
<i>A.niger</i>	1	/	Bleu	0.03
	2	/	Bleu	0.35
	3	/	Bleu	0.38
	4	/	Bleu	0.45
	5	/	Bleu	0.51
	6	/	Vert	0.56
	7	/	Bleu	0.6
<i>A.flavus</i>	1	/	Bleu	0.1
	2	/	Bleu	0.41
	3	Rouge	Rouge	0.45
	4	/	Bleu	0.48
	5	/	Vert	0.56
	6	/	Vert	0.62
	7	/	Bleu	0.67
	8	/	Bleu	0.70
<i>A.fumigatus</i>	1	/	Bleu	0.1
	2	/	Bleu	0.32
	3	/	Vert	0.42
	4	/	Bleu	0.45
	5	/	Vert	0.50
	6	/	Vert	0.58
	7	/	Vert	0.62
	8	/	Bleu	0.66
	9	/	Bleu	0.71
	10	/	Bleu	0.76

2.3. Analyse des mycotoxines par HPLC

Dans le but d'obtenir une séparation satisfaisante et plus rapide des mycotoxines. Le système Hplc à été effectué en gradient d'élution linéaire. De ce fait la phase mobile HPLC à été testée avec l'acétonitrile comme solvant.

Les figures (20, 21 et 22) montrent les différents profils chromatographiques obtenus par analyse en HPLC des cultures des trois souches *A.niger*, *A.flavus* et *A.fumigatus*

D'après les chromatogrammes, nous avons observé que les métabolites séparés ont des temps de rétention très voisins du fait de la similitude de leurs propriétés physicochimiques.

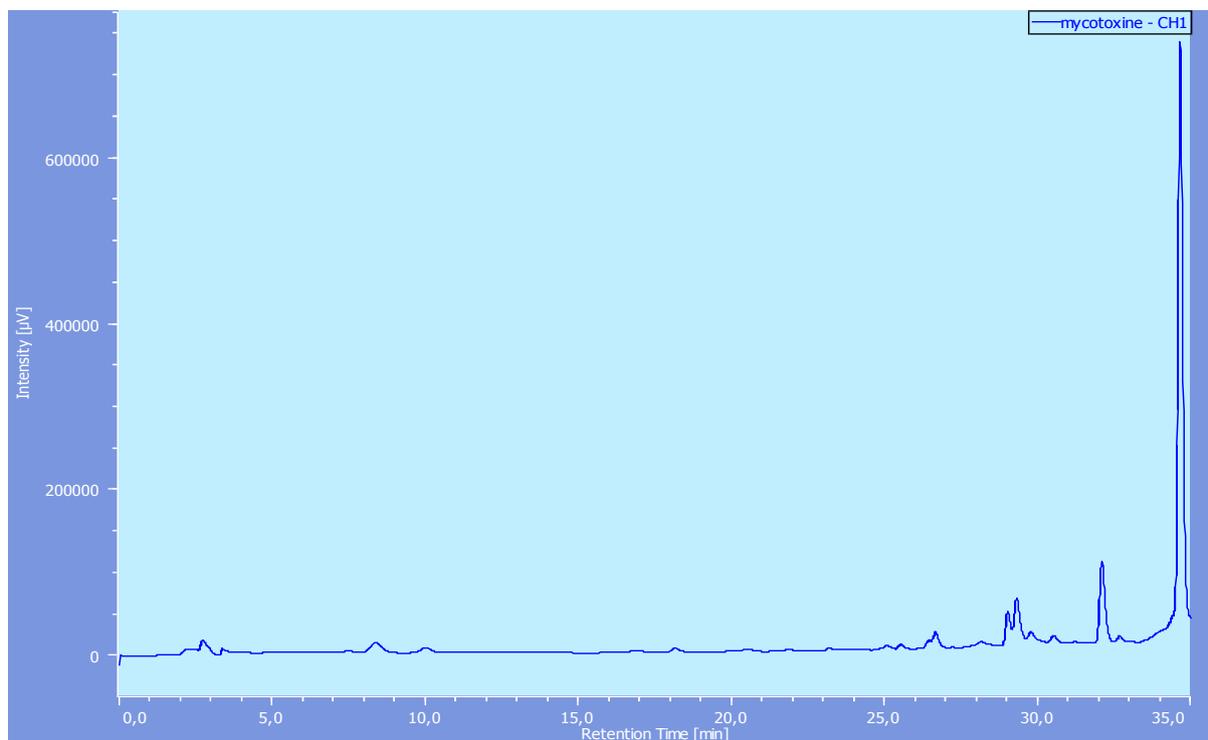


Figure 20 : Chromatogramme de l'analyse par HPLC-UV de l'extrait brut de l'*A.niger*

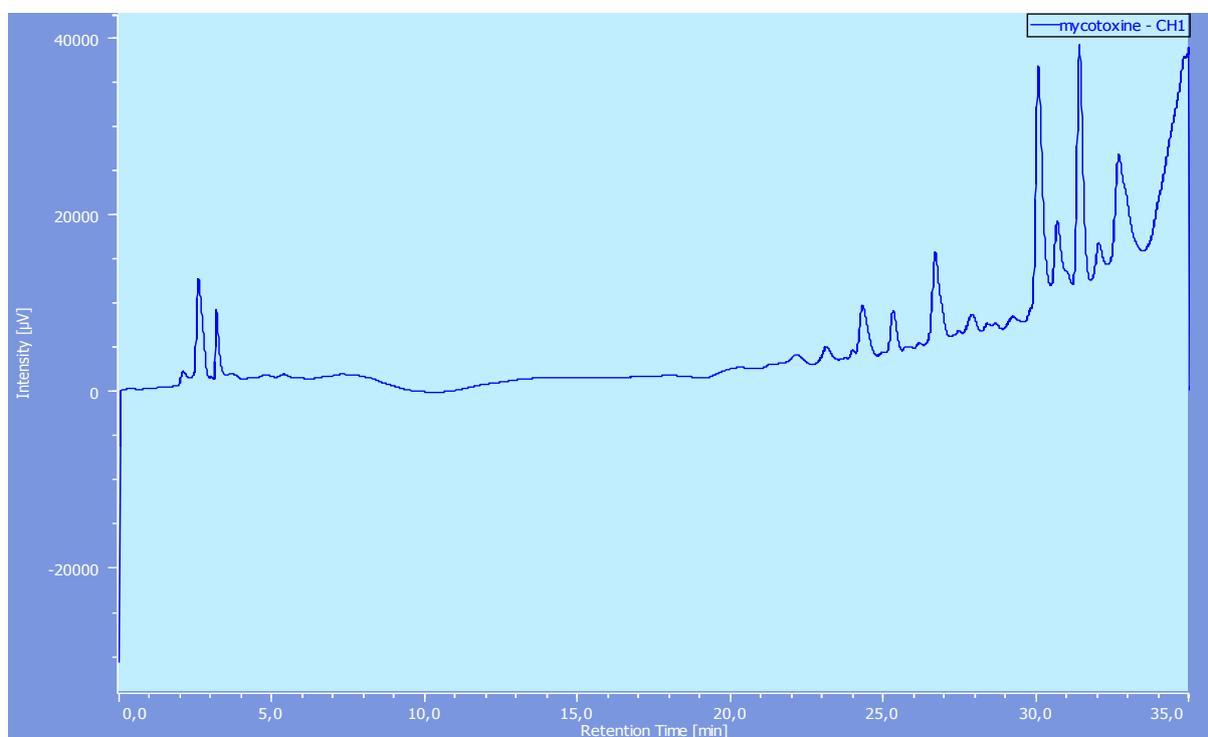


Figure 21: Chromatogramme de l'analyse par HPLC-UV de l'extrait brut de l'*A.flavus*

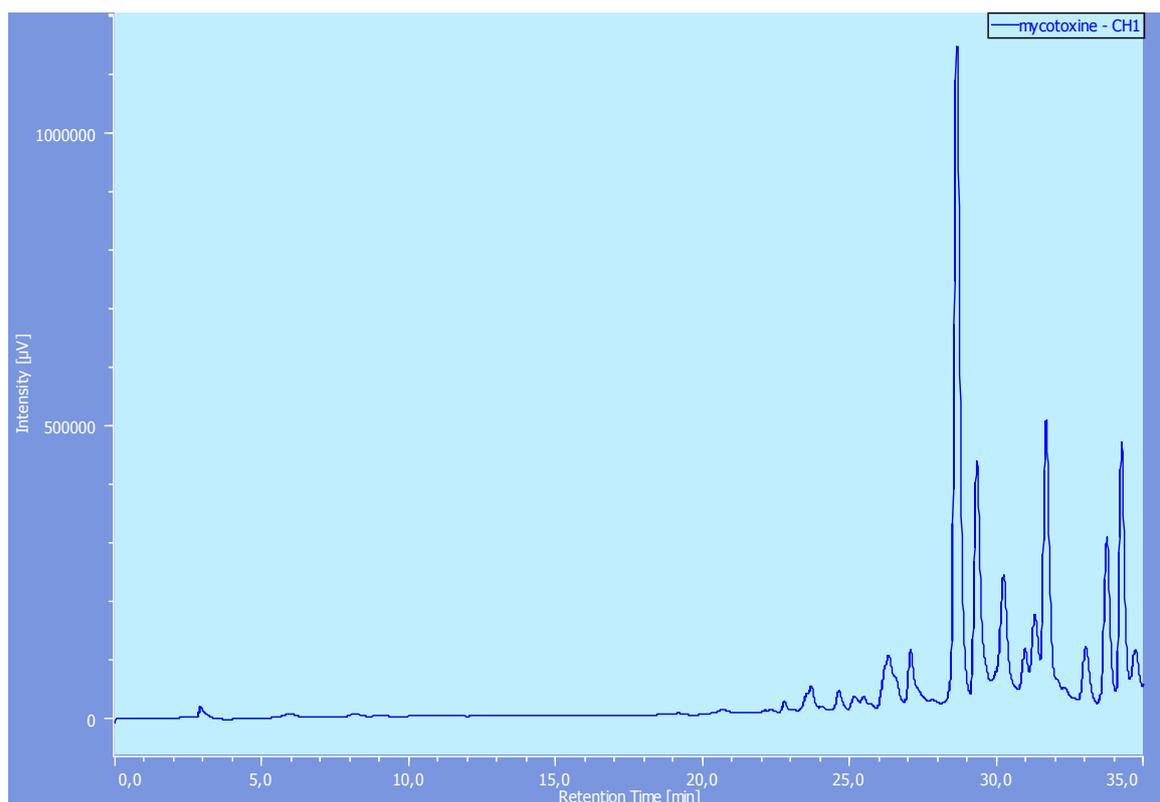


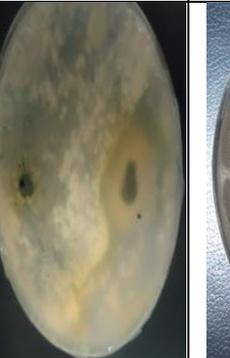
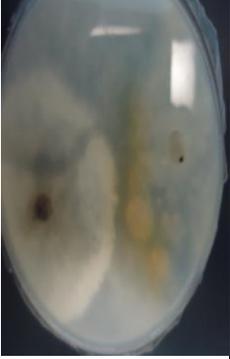
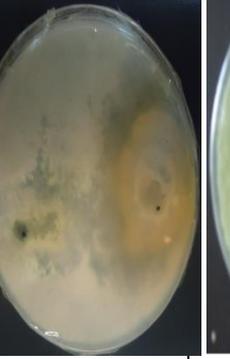
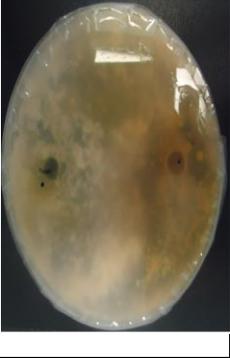
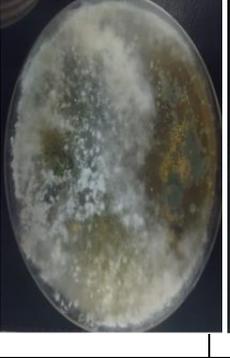
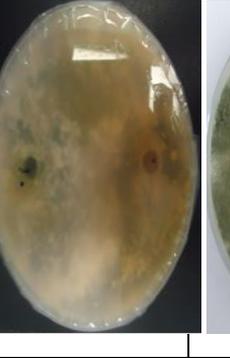
Figure 22 :Chromatogramme de l'analyse par HPLC-UV de l'extarait brut de l'*A.fumigatus*

3. Approche de la lutte biologique (Test de confrontation directe)

3.1. Effet sur la croissance mycélienne

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène/Antagoniste). Après 7 jours d'incubation une action inhibitrice exercée par *Trichoderma sp* vis à vis de la croissance mycélienne des pathogènes (*A .flavus*, *A.fumigatus* et *A.niger*) a été observée (Tableau 13)

Tableau 13 : Effet de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne d *A.niger*, *A. flavus* et *A. fumigatus*

Les souches	<i>Trichoderma sp</i> isolé à partir du blé traité		<i>Trichoderma sp</i> isolé à partir du blé non traité		Témoins
	Recto	Verso	Recto	Verso	
<i>A.niger</i>					
<i>A. flavus</i>					
<i>A. fumigatus</i>					

L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma sp* estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne confirme ces résultats. (Tableau 14).

Tableau 14: Taux d'inhibition exercé par l'antagoniste vis a vis *A. niger*, *A.flavus* et *A.fumigatus*

	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	
	Le diamètre moyen du champignon pathogène (cm)							
Co (Ø d' <i>A.niger</i> en absence d'antagoniste)	0,7	1,7	3,8	5	5,6	7	8	
Cn (Ø d' <i>A.niger</i> en présence d'antagoniste)	0,7	0,7	1	1,8	2	2,5	3	64%
Cn (Ø d' <i>A.niger</i> en présence d'antagoniste)	0,7	0,7	1,1	2	3	3,3	3,4	55%
Co (Ø d' <i>A.flavus</i> en absence d'antagoniste)	0,7	0,7	4,2	7	7,3	8	8	
Cn (Ø d' <i>A. flavus</i> en présence d'antagoniste)	0,7	0,7	0,9	1	1,3	1,8	2	77%
Cn (Ø d' <i>A.flavus</i> en présence d'antagoniste)	0,7	0,7	1	1,6	1,8	2	2,3	72%
Co (Ø d' <i>A.fumigatus</i> en absence d'antagoniste)	0,7	2,3	5,6	8	8	8	8	
Cn (Ø d' <i>A. fumigatus</i> en présence d'antagoniste)	0,7	0,7	1,2	1,8	2	2,4	2,5	73%
Cn (Ø d' <i>A.fumigatus</i> en présence d'antagoniste)	0,7	0,7	1,1	1,8	2	2,8	2,9	71%

Après 168 heures d'incubation à une température de 25°C, la majorité des isolats fongiques à la présence d'antagoniste occupent que des surfaces varies de 20 mm à 34 mm. Ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 50 %. Le témoin des pathogènes cultivés seuls occupe des surfaces de 80 mm de diamètre (Figures 23,24 et 25).

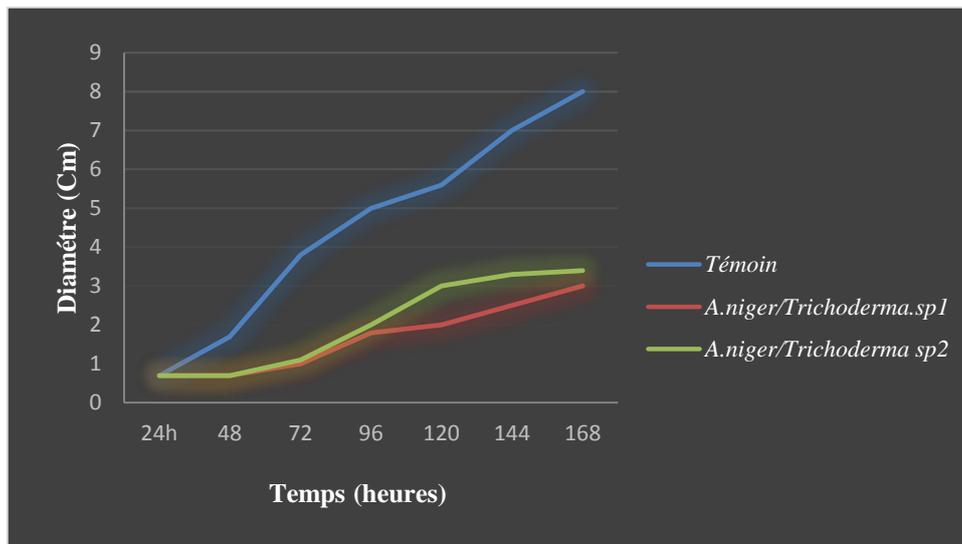


Figure 23 : Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp1* et *Trichoderma sp2* sur la croissance mycélienne d'*A .niger*

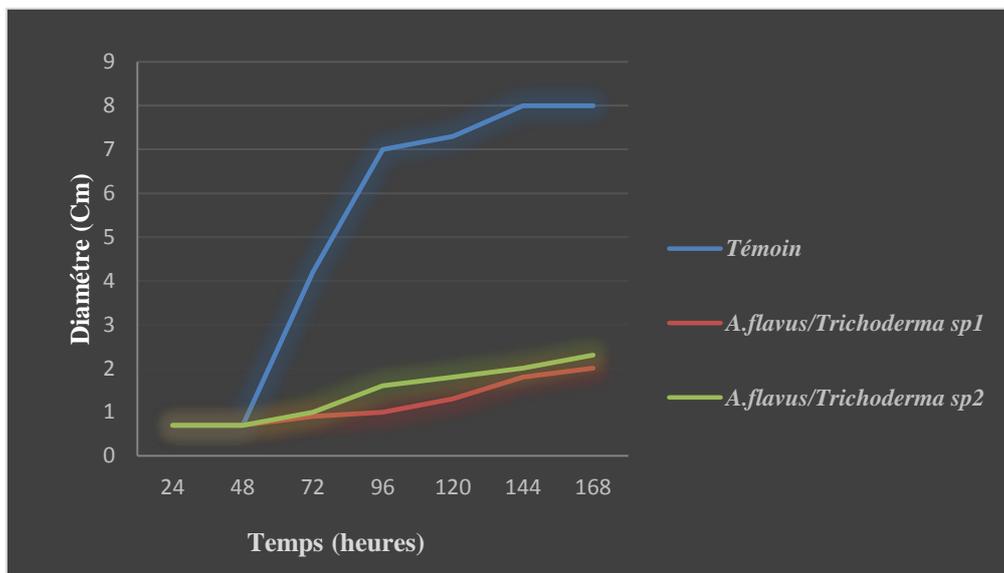


Figure 24 : Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp1* et *Trichoderma sp2* sur la croissance mycélienne d'*A .flavus*

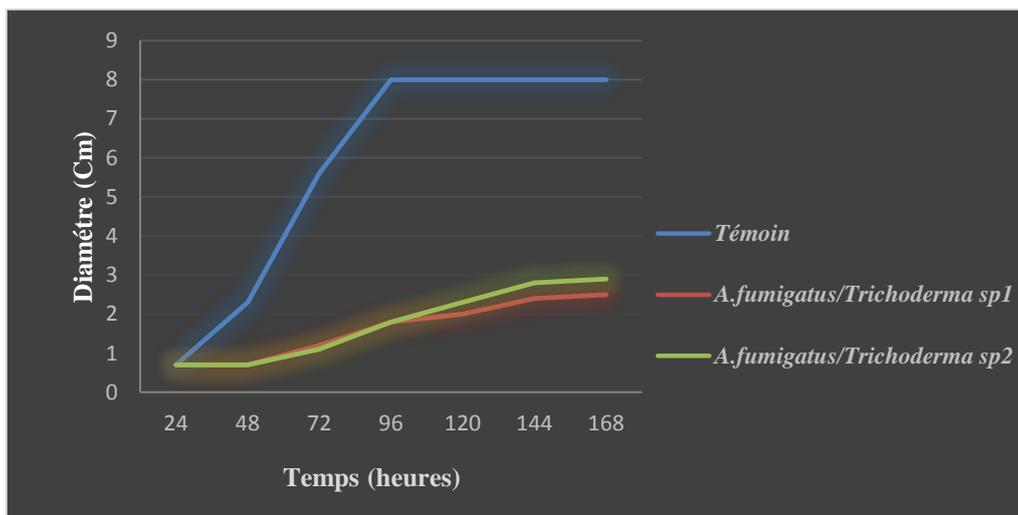


Figure 25: Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp1* et *Trichoderma sp2* sur la croissance mycélienne d'*A .fumigatus*

3.2. Effet sur la sporulation

L'étude de la sporulation des isolats d'*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* en bordure de *Trichoderma sp1* et *Trichoderma sp2* ont révélé une inhibition significative par rapport au témoin.

L'analyse statistique des trois pathogènes ayant révélée que la moyenne de sporulation en confrontation avec l'antagoniste est de 8.10^6 , $4,5.10^6$ et 2.10^6 spores/ml pour *A .niger*, *A.fumigatus* et *A.flavus* respectivement alors que la sporulation du témoin est de $14,92.10^6$, 29.10^6 et 11.10^6 spores /ml respectivement .(Figure26)

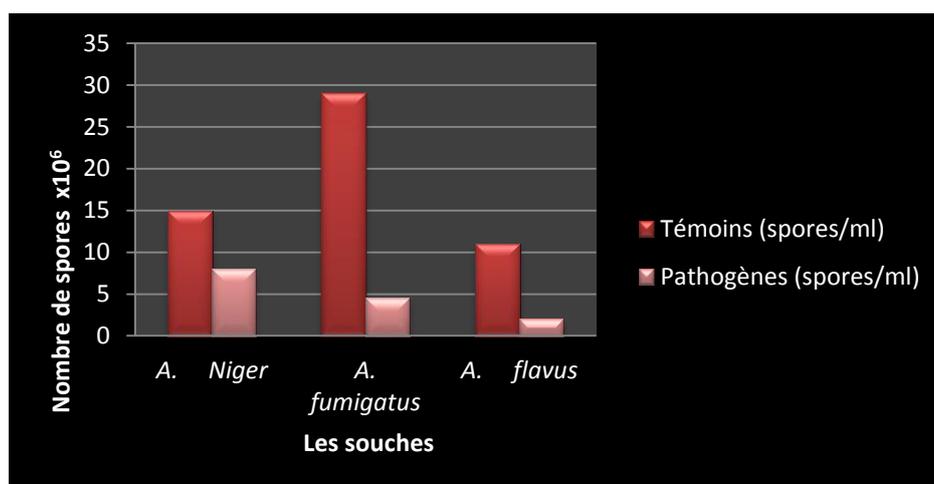


Figure 26: L'analyse statistique d'*A. flavus*, *A. fumigatus* et *A. niger*

Discussion

Les céréales sont des denrées alimentaires fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, ou au cours du stockage des grains.

L'altération des céréales stockés a fait l'objet de nombreuses études ayant mis en évidence que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales expliquée par des variations dans les paramètres technologiques du grain et par les pertes considérables (Atalla *et al.*, 2003 ; Molinie *et al.*, 2005).

Lors de la contamination du blé, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production de toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en mycoflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage des grains (Zia-Ur-Rahman, 2006).

Dans un premier volet, une analyse mycologique des grains de blé dur (traité et non traité) a été effectuée. Les résultats de cette analyse ont révélé une contamination par les moisissures dans les deux échantillons.

25 souches ont été détectées dans les grains, dont 16 ont été détectées dans les grains non traités et 09 dans les grains traités. Cette différence de contamination fongique entre les deux échantillons de blé (traités et non traités) peut être expliquée par l'utilisation des produits chimiques (fongicides) qui ont permis la réduction et la diminution du taux de cette contamination. Cette différence est influencée parfois par les conditions climatiques, les conditions de stockage (humidité, température et système de ventilation) et l'installation d'une charge fongique importante, ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la mycoflore (Le Bars *et al.* , 1987 ; Miller, 2002). Wilson *et al* (2002), rapportent que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement liée aux conditions hydrothermiques.

Les trois milieux (PDA, CEA et DRBC) utilisés au cours de cette étude ont été décrits par plusieurs auteurs pour l'isolement des moisissures contaminants les aliments (Azzoun, 2012 ; Gacem, 2011). Ces trois milieux nous ont donnée une croissance variable, cela est peut être expliqué par la différence dans la composition des deux milieux de cultures et le choix des substrats préférés par les souches fongiques, tel que rapporté par l'organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP, 2003), que le milieu PDA est préparé à base d'élément organique et le milieu CEA est préparé à base d'élément minéral.

La flore fongique totale des grains de blé est constituée essentiellement de moisissures filamenteuses, très sporulantes, dotées d'un grand pouvoir de dissémination dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus rencontrés.

Les différents genres de moisissures que nous avons pu identifier sont des contaminants des denrées alimentaires maltraitées mais surtout mal conservées, ils sont considérés comme contaminants de stockage des céréales et leurs dérivés (Berthier et Valla, 1998).

La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminante des céréales a été reportée dans plusieurs travaux (Le Bars *et al.* , 1987 Riba *et al.* , 2005). Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (Withlow *et al.* , 2001). Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, il faut souligner la grande dominance d'*Aspergillus flavus* suivi d'*Aspergillus fumigatus* dans les deux échantillons. Cette fréquence de contamination importante est accompagnée aussi par une production de mycotoxines.

Les autres souches isolées des échantillons analysés appartiennent aux genres *Rhizopus*, *Alternaria* et sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol (Withlow *et al.* , 2001). La présence du genre *Alternaria* dans le blé non traité semble être due à l'humidité élevée de cet échantillon. Ces mêmes résultats ont été constatés par Weindenborner (2000).

Les genres *Cladosporium* et *Ulocladium* détectés sur les grains de blé non traités appartiennent à la flore du champ et la flore intermédiaire.(Gacem, 2011).

Dans l'ensemble, le taux de contamination élevé, ainsi que la biodiversité assez importante constatés dans les deux échantillons du blé dur peuvent être expliqués probablement par la qualité, la durée et les conditions de stockage (Davis *et al.* , 1987).

Du point de vu mycotoxicologique, Les différentes souches d'*Aspergillus* purifiées et identifiées sont potentiellement toxigènes (Lemke *et al.* , 1988).

Le dosage qualitatif (par CCM) des mycotoxines au niveau des échantillons de blé (traités et non traités) s'est révélé négatif (absence de mycotoxine dans le substrat) pour l'ensemble des échantillons.

L'absence de mycotoxines peut être expliquée soit par la possibilité que les souches d'*Aspergillus* isolées de ces échantillons sont toxigènes et les conditions de température et d'humidité n'étaient pas favorables à l'écotoxigénèse, soit les taux d'aflatoxines et

d'ochratoxines sont inférieurs au seuil de détection de cette méthode qui est de 0.5 ppb (poids par billion) (Zakaria *et al.* , 1992).

Pour étudier la production des mycotoxines par les espèces *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*, ces trois souches ont été cultivées sur le milieu Czapeck dox additionné à l'extrait de levure. Selon Bennett *et al.*,(2003) ce milieu donne une production optimale des mycotoxines.

Après une extraction par le chloroforme des surnageants des trois souches, les extraits actifs ont été soumis à une analyse par chromatographie sur couche mince(CCM) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

L'application de l'extrait brut d'*Aspergillus niger* sur le gel de silice (CCM) a révélé plusieurs bandes fluorescentes, dont l'ochratoxine A (OTA) qui est caractérisée par une fluorescence bleu vert et un Rf de 0,52 , les résultats issus de l'analyse par HPLC confirme la présence de l'OTA qui a un temps de rétention de 32,2min .Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Scott *et al.*,1970.

la fluorescence bleue détectée par l'UV, le Rf = 0,67 et le temps de rétention :3,85 min sont trois paramètres qui indiquent la production de l'aflatoxine B1 par l'espèce *Aspergillus flavus*. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Bennet *et al.*,2003.

L'analyse également de l'extrait brut d'*Aspergillus fumigatus* par CCM a montré la présence de différentes taches. Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par (Tepsic *et al.* ,1997; Kosalec *et al.* , 2005) qui ont déduit que les taches ayant des Rf = 0,45 ; 0,50 et 0,62 respectivement correspondent a la gliotoxine, la verruculogène et la fumagilline et présentent respectivement 5,95 ; 24,61 et 27,05 min comme temps de rétention

Dans un deuxième volet et afin de réduire la contamination des grains par les moisissures, nous avons effectué un essai de lutte biologique avec un champignon antagoniste (*Trichoderma sp*)

Les essais d'antagonisme ont donné des résultats intéressants et satisfaisants .En effet, l'essai de confrontation directe entre les trois pathogènes et (*Trichoderma sp1*, *Trichoderma sp2*) ont révélé que ces dernières ont pu inhiber la croissance mycélienne des pathogènes. Ces résultats sont en parfaite conformité avec ceux obtenus par Lannuse *et al.*,(1983), Besselate(1985) ,Chet(1984) et Dubordieu(1983)qui ont indiqués que Les *Trichoderma* sont connus de longue date pour leurs activités antagonistes à l'égard de nombreux champignons tels que les espèces de *Botriti scinerea*, *Armilaria obscura*, *Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica*.

L'envahissement du mycélium du pathogène par *Trichoderma sp* a également été observé par Benhamou et Chet (1997) en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture entre cet antagoniste et un champignon tellurique, le *Pythium ultimum* au bout de 4 jours d'incubation. D'après Comporta (1985), cette interpénétration favorise l'action des enzymes (β 1-3 glucanase, chitinase) conduisant à la lyse du mycélium du parasite.

Nous avons observé que l'*Aspergillus flavus* possède une croissance mycélienne très lente. Dans ce cas l'antagoniste montre la capacité d'arrêter à distance le développement du parasite avec formation d'une zone d'inhibition entre les colonies confrontées dont la largeur varie selon l'isolat.

Cette interprétation peut aussi être expliquée par le mécanisme d'antibiose, qui se résulte de la production de substances qui agissent comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène. Cette constatation est en accord avec les études précédemment réalisées par Haran *et al.*, (1996), Zhihe *et al.*, (1998) qui ont montré que *Trichoderma viride* sécrète des antibiotiques tels que la gliotoxine.

A l'instar de ces résultats, nous pensons que *Trichoderma sp* possède une aptitude pour éliminer les champignons contaminants et peut donc avoir des intérêts pratiques en lutte biologique.

Conclusion et perspective

Au cours de notre étude, menée sur l'étude de la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxine isolée à partir des grains de blé traités et non traités, le premier objectif identifié fut l'étude de la qualité microbiologique des grains de blé stocké à l'OAIC de la wilaya de Constantine.

Pour répondre à cet objectif, un échantillon représentatif de chaque échantillon de blé (traité et non traité) a été analysé.

Les analyses mycologiques effectuées sur les deux échantillons de blé ont permis d'isoler 25 souches fongiques ; 16 souches à partir des grains de blé non traités et 09 souches à partir des grains traités.

La purification et l'identification des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier Sept genres de moisissures: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria* et *Ulocladium* ; avec une dominance du genre *Aspergillus* dans les deux échantillons.

Le genre *Aspergillus* représenté par trois espèces (*A.flavus*, *A.niger* et *A.fumigatus*) été retrouvé dans les deux échantillons analysés avec une fréquence et une abondance élevée. Ces trois espèces ont été révélées productrices de mycotoxines.

La recherche des mycotoxines sur les différents substrats analysés s'est révélée négative. L'absence des mycotoxines sur le blé dur traité et non traité malgré la présence des souches productrices de ces toxines pourrait être expliquée par les conditions d'un environnement défavorable pour la synthèse de ces dernières.

L'analyse des mycotoxines par CCM et HPLC a révélé la production de l'Aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*, l'ochratoxine A par *Aspergillus niger*, et la production de la fumagilline, la gliotoxine et la verruculogène par l'espèce *Aspergillus fumigatus*

Afin de réduire la contamination des grains de blé par les moisissures et les mycotoxines, un essai de lutte biologique avec l'antagoniste (*Trichoderma sp*) a été réalisé.

Les tests de confrontation d'une façon directe sur milieu de culture ont révélé un effet fongistatique sur la croissance et la sporulation du pathogène.

Dans le cas du contact entre *Trichoderma sp* et le pathogène (confrontation directe), ce premier envahit les colonies du pathogène. De même *Trichoderma sp* a permis de mettre en évidence un ralentissement de la croissance mycélienne des trois souches d'*Aspergillus*.

A l'instar de ces résultats, nous pensons que *Trichoderma sp* possède une aptitude pour éliminer les *Aspergillus* (moisissures de stockage) et peut donc avoir des intérêts pratiques en lutte biologique.

Au terme de cette étude, nous fixons certains points comme perspectives :

- ✓ Identification moléculaire des souches fongiques isolées du blé dur pour connaître leur origine et leur toxicité (et même la possibilité de mutation) ;
- ✓ Extraction et caractérisation des composés actifs par des méthodes plus spécifiques ;
- ✓ Réalisation d'une étude toxicologique avant l'application des extraits au niveau des silos de stockage.

En vue d'une lutte biologique contre les champignons toxinogènes, il serait intéressant de:

- Etudier l'influence de la compétition ou la synergie entre les champignons qui partagent les mêmes niches écologiques, notamment le genre *Aspergillus*, sur la production des mycotoxines ;
- Rechercher des champignons qui peuvent se nourrir de mycotoxines ;
- Sélectionner génétiquement des plantes résistantes à l'invasion de ces mycotoxines.

Références Bibliographiques

- **Abeledo L.G., Savin R., Gustavo A and Slafer R (2008)**. Wheat productivity in the Mediterranean Ebro Valley: Analyzing the gap between attainable and potential yield with a simulation model. *Europ. J. Agronomy*. p: 541-550.
- **Adams Martin R and Moss Maurice O.(2008)**. Food microbiology. RSC Publishing. The Royale Society of Chemistry. Third Edition; p: 463.
- **Afnor S (1986)**. Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2emeEd, Lavoisier TEC et DOC, Paris, p: 250-263
- **Afssa, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2009)**. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final. Maisons-Alfort.p: 308.
- **Agag B.I. (2004)**. Mycotoxins in foods and feeds 3-Zearalenone. *Ass. Uni. Bull. Environ. Res.* (7):2.
- **Alabouvette C., Couteaudier Y and Louvet, J. (1983)**. Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, p:7-16. XXIV. Colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).
- **Amrouche A. (2007)**. Étude mycologique et mycotoxicologiques du blé tendre local et importé et ses dérivés de meunerie (farines et sons) stockés dans la région de Bechar. Extraction et détection des aflatoxines par méthode chromatographique. Thèse de magistère en biologie, Université de Bechar, Algérie.
- **Andersen B., Kroger E and Roberts R.G. (2002)**. Chemical and morphological segregation of *Alternaria Arborescens*, *Alternaria Infectoria* and species-groups. *Mycol Res*, p: 170-180. *Alternaria Tenuissima*
- **Anonyme A. (2006)**. Re: Avant 1830 l'Algérie exportait son blé au monde entier mais 132 ans de colonialisme et après l'Algérie importe du blé, à qui la faute ? C'est clair. <http://newsgroups.derkeiler.com/pdf/Archive/Soc/soc.culture/200602/msg00013.pdf>. (31/05/2008/14:00).
- **Atalla M.M., Mohamed-Hassanein N., Atef-Elbeih A and Yoyssef A. (2003)**. Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergillus* in relation to different relative humidity and storage periods. *Food Nahrung*. p: 6-10.

- **Atoui A.(2006)**. Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: étude moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat d'université : Microbiologie et biocatalyse industrielles. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. p: 245.
- **Bajji M. (1999)**. Étude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur : caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance à la sécheresse et de variants somaclonaux sélectionnés In vitro. Thèse de doctorat. Univ . Louvain.
- **Bankole S.A. (1997)**. Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B1 production in maize grain by a toxigenic *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*. p: 190–192.
- **Barnes S.E., Dola T.P., Bennett J.W and Bhatnagar D. (1994)**. Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia*.
- **Belli N., Marin S., Sanchis V and Ramos A.J. (2004)**. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section Nigri obtained from grapes. *Inter. J. F. Microbiol.* p: 19-27.
- **Benhamou N and Chet I. (1997)**. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 2095–2099.
- **Bennett J.W and M. Klich. (2003)**. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* p: 497-516.
- Benmansour-Brixi G.N. (2005)**. Étude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de magister de biologie, Université de Djillali liabes de Sidi Bel Abbés, Algérie.
- **Berthier J., Valla G. (1998)**. Moisissures - Mycotoxines et Aliments : du Risque à la Prévention. Université Claude Bernard, Lyon. p:05-20.
- **Besselat B. (1985)**. Résultats obtenus par le service de la protection des végétaux dans le cadre de la lutte contre la pourriture grise de la vigne avec utilisation du *Trichoderma*. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, p:51-58. INRA, Paris (FR).

- **Boiron P. (1996)**. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.p:13-69.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpen J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y and Veau P.(1990)**. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p :34-428.
- **Boudreau A and Ménard G. (1992)**. Le blé : Eléments fondamentaux et transformation. Presses de l'Université Laval .Paris. p: 439 .
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F and Zucca J. (1996)**. Microbiologie Alimentaire. Tome1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Technique et doc Lavoisier, Paris, p: 672
- Brochard G and Le Bâcle C. (2009)**. Les mycotoxines en milieu de travail. Documents pour le Médecin du travail N°119. INRS
- **Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L ., Brun S and Penn P. (2002)**. Cahier de formation biofarma : les moisissures d'intérêt medical. Labo Analy De biomédicale.
- **Charles M. (2010)**. Evolution des génomes du blé (genres *Aegilopset Triticum*) au sein des *Poaceae*. Dynamique rapide de l'espace occupé par les éléments transposables et conservation relative des gènes. Thèse de doctorat d'université: Bioinformatique et analyse des génomes. Évry: l'université d'Évry-Vald'Essonne.
- **Chawla K. (1984)**. Management of Cereal Grain in Storage. AGRI-FACTS. Practical Information for Alberta's Agriculture Industry. p: 1-5.
- **Cheftel J.C and Cheftel H. (1977)**. Introduction a la Biochimie et a la Technologie des aluments.II-. Graines végétales. Technique et Documentation-Lavoisier. P: 105-130.
- **Chellali B. (2007)**. Marché mondial des céréales : L'Algérie assure sa sécurité alimentaire. <http://www.lemaghrebz.com/admin/folder01/une.pdf>. (31.05.2008).
- **Chet I. (1984)**. Application of *Trichoderma* as a bio control agent, p:110-111 Proc. 6th cong. Un Phytopathol. Mediterr. , Cairo (Egypt).
- **Christensen Clyde M and Kaufmann Henry H. (1969)**. Grain storage. The role of fungi in quality loss. Minnesota archive Editions; p: 153 .

- **Chung D.H., Abouzied, M. M and Pestka, J. J. (1989).** Immunochemical assay applied to colocythis sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Memoire de Magister en biologie, Universite Kasdi Merbah, Ouargla.

- **Comporata L. (1985).** « Antagonisme in vitro de *Trichoderma sp* vis à vis de *Rhizoctonia solani*, p: 613-620. INRA Paris (FR).

- **Daami- Remadi M., El Mahjoub M. (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. l'INRAT 74, p:167–186

- **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris (FR).p:383.

- **Davet R.(1997).** La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Davis N.D and Diener U.L.(1987). Mycotoxins, in: Food and Beverage Mycology, 2nd Ed, Van Nostrand Reinhold, New York, p:517-570.

- **Deàk Tibor. (2008).** Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press. Second Edition. p: 325.

- **Dendy D.A.V and Dobraszczyk. (2000).** Cereals and Cereal Products: *Technol.Chemistry*. Springer; p: 370.

- **Denis C and Webster I. (1971).** « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. *Trans.Br. Mycol* p:41-48

- **Derache R. (1986).** Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation Lavoisier, Paris, p: 105-126.

- **Dijksterhuis J and Samson Robert A. (2007).** Food mycology. A multifaceted Approach to fungi and food. CRC Press; p: 403.

- **Djossou O., Perraud-Gaime I., Lakhel Mirleau F ., Rodriguez-Serrano G., Karou G ., Niamke S., Ouzari I., Boudabous A and Roussos S. (2011).** Robusta coffee beans post harvest microflora: *Lactobacillus plantarum sp.* as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. Anaerobe. p: 1-6

- **Doumandji A., Doumandji-mitiche B., Salaheddine D. (2003).** Cours de technologie des cereales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, p: 1-22.

- **Druvefors U.A. (2004)**. Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala* Doctoral thesis. University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, Department of Microbiology. Agraria.p: 44 .
- **Dubos B. (1985)**. L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, p:35-49. INRA, Paris (FR).
- **Dubourdiou, D. (1983)**. Dégradation du glucane de *Botrytis cinerea* par les β 13 glucanase de *Trichoderma sp.*XXIV colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).p: 35-49.
- **Duron B. (1999)**. Le Transport Maritime des céréales. Mémoire pour le D.E.S.S."Transports maritimes et aériens".Option Droit maritime et Droit des transports. Faculté de droit et de science politique d'aix-marseille. p:81.
- **Eckwall E.C and Schottel J.L. (1998)**. Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain Pon SSII. *J Ind Microbiol Biotechnol.* p:5-22.
- **Ehrlich, K. C ; Montalbano B. G ; Cotty, P. J. (2005)**. Divergent regulation of aflatoxin environmental microbiology. *American Society for Microbiology* . p :1808-1810.
- **Esteben A., Abarca M.L., Bragulat M.R and Cabanes F.J. (2004)**. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black *Aspergillus*. *Res. Microbiol.* p:861-866.
- **Fao. (2007)**. Statistical database of the food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org>. (Consulté le 11/01/2010).
- **Feillet P. (2000)**. Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris; p: 308 .
- **Filtenborg O., Frisvad J.C and Thrane U. (1996)**. Moulds in food spoilage. *Inter. J. F Microbiol.* p: 85-102.
- **Flamini G and Luigi Cioni P.(2003)**. Activity of Plant Extracts, Essential Oils, and Pure Compounds Against Fungi Contaminating Food stuffs and Causing Infections in Human

Beings and Animals: A Six-Year Experience (1995-2000). Food products press :Crop Science ;New york. p :279-297

- **Gacem M.A., Ould El Hadj K.A and Gacemi B. (2012).** Étude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Alg.J.Env. p* :67-76.

- **Gacem M.A. (2011.)** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus*

- **Geacintov Nicholas E and Broyde S. (2011).** The chemical biology of DNA damage. Wiley-VCH;p: 471.

- **Gengan R. M., Chuturgoon A. A., Mulholland D. A and Dutton, M. F. (1999).** Synthesis of sterigmatocystin derivatives and their biotransformation to aflatoxins by a blocked mutant of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 144 : 115–122.

- **Godon B. (1991).** Biotransformation des produits céréaliers. Technique & documentation Lavoisier, Paris, p: 221.

- **Godon B and Loisel W. (1997).** Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. Edition Technique et Documentation Lavoisier., Paris. p: 819 .

- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaires. (edn) Dunod. Paris.p : 651.

- **Guiraud, J. P .** Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod, 1998. Chapitre, Milieu et réactif. P :522. ISBN : 2 10 003666 1

- **Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K and Wicker, L. (1991).** Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *J.F. S* :56. p:408483.

- **Hmouni A ., Hajlaoui M.R and Mlaiki A. (1996).** Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. OEPP/EPPO *Bull.*p: 697–705

- **Hornb B.W., Greene R.L., Sobolev V.S., Dorner J.W., Powell J.H., Layton R.C. (1996).** Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamaritii*. *Mycol* .p:574-587.

- **Jouany J. P and Yiannikouris A. (2002).** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Productions Animales. p: 3-16.
- **Joyeaux, A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. In : Durant G., Monsan. (ed.), Les enzymes production et utilisations industrielles. Edition Gautier Villars. Paris. p: 22-46.
- **Klich M., Mendoza C., Mullaney E., Keller N and Bennett, J. W. (2001).** A New sterigmatocystin-producing *Emericella* Variant from Agricultural Desert Soils. *System. Appl.*
- **Krska R. (2009).** Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* p:1203–1204.
- **Kurtzman C.D., Horn B.W., Hesseltine C.W. (1987).** *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek.* p:174- 158.
- **Labbé Ronald G., García S. (2001).** Guide to food borne pathogens. Wiley; p :400 .
- **Lanusse M., Lung-escarmant B., Dubot B., Taris B. (1983).** Etude in-vitro des propriétés antagonistes de 8 espèces de *Trichoderma* à l'égard de deux souches d'*Armillaria mellea*. XXIV colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR). p:179-192
- **Larpent J.P.(1990).** Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2eme Ed, Masson, Paris.p :512.
- **Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G and Marinelli, F. (2001).** Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* p:399–405.
- **Le Bars J., Le Bars P.(1987).** Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987.
- **Leclerc F.C., Papon N., Noel T., Villard J. (2005).** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires.* p : 61-66.
- **Leclerc H., Gaillard J.L and Simonet M. (1995).** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Edition Doin, Paris.p:119-133-134-194.

- **Lemke P.A., Davis N.D and Creechgregory W.(1989)**. Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species, applied and environmental microbiology. *Amer.Soc .Microbiol.* p:1808-1810
- **Lemke P.A., Davis N.D., Iyer S.K., Creech G.W., Diener U.L. (1988)**. Fluor metric analysis of iodinated aflatoxin in minicultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Indust. Microbiol*, p: 119-125
- **Leyral G., Vierling E. (2003)**. Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires .Lavoisier Tec et Doc, France. p:154-158.
- **Linden G and Lorient D. (1994)**. Biochimie agro-industrielle. Masson. Paris. p: 360 .
- **Magan N., Hope C.V. and Aldred D. (2003)**. Post – harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Euro. J. Plant. Pathol* 109, p:723-730.
- **Magan N., Lacey J. (1988)**. Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology Elsevier*. p: 245- 256.
- **Magan N and Olsen M. (2004)**-Mycotoxines in food: Detection and control. *F.Sc. Technol.*p:190-203.
- **Maskey L.N., Helander I.M and Latva-Kala K. (2003)**. Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-bacteria. *J.Agr. F. Chem.* p:3590-3595.
- **Maslouhi A. (1989)**. Contribution à l'étude in vitro des antagonistes de *Fusarium oxysporum*, F.sp *Albedinis*, agent causal du Bayoud, p 4-8. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc) .
- **Mathew S ., Thomas G and Tufail A. (2011)**. An Evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal.J.Biotechnol., Microbiol.* p :131–138.
- **Miller J.D. (2002)**. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol.* p: 19-27.
- **Mills, J.T ; Sinha, R.N ; Wallace, H.A.H. (1978)**. Multivariate evaluation of isolation techniques for fungi associated with stored rapeseed. *Phytopathol* p:1520-1525.

- **Mirete S., Pation B., Vazquez C., Jimenez M., Hinojo M.J., Soldevilla C and Gonzalez-Jaen, M.T. (2004).** Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *Inter J F Microbiol.* p: 213–221.
- **Molinie A., Faucet V., Castegnaro M and Pfohl-Leszkowicz A. (2005).** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *F. Chem.* p: 391-400.
- **Mosiniak M., Prat R and Roland J.C.(2001).** Du blé pain. Copyright " Biologie et Multimédia".
- **Multon J.L. (1982).** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique et Documentation ,Paris Apria.p: 576.
- Neergaard P. (1977).** Seed pathol (11). MacMillan; p:1187.
- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T and Killington R.(2000).** L'essentiel en microbiologie.Edition Berti. p :210-217.
- **Nishio N and Nagai, S.(1981).** Single cell protein production from mandarin orange peel. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol .*p: 156-160.
- **OEPP . (2003).** Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. Normes OEPP Bulletin. p: 245–247.
- **OMS. (1980).** Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. Publications. De l'OMS Genève. p: 142.
- **Pamel E.V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A and Daeseleire E. (2010).** Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p: 1-11.
- **Patel J., Brown M.E.(1969)** .Interactions of *Azobacter* with rhizosphere and root- surface microflora. Plant and soil..

- **Pfohl-Leszkowicz A. (1999).** Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris. p: 478.
- **Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L and Piva G. (2004).** Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Addit. Contam.* p: 479-487.
- **Pitt John I and Hocking Ailsa D. (2009).** Fungi and food spoilage. Third Edition. Springer Science. p: 519.
- **Placinta C.M., D'Mello J.P.F and Macdonald, A.M.C. (1999).** A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal feed science and Technology.* p: 21-37.
- **Prats J Clément and Grandcourt M. (1971.)** Les Céréales. 2^e édition Baillièrè et Co. Collection d'enseignement agricole. p:15-314.
- **Rabie C. J., Steyn M and Van Schalkwyk G.C. (1977).** New species of *Aspergillus* producing
- **Rapilly F. (1968.)** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties.* N° hors-série. INRA. Paris. P : 25-39.
- **Reboux, G. (2006).** Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* p: 208–212.
- **Riba A., Sabaou N., Mathieu F and Lebrihi A. (2005).** Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.
- **Rivière J.(1975).** Les applications industrielles de la microbiologie. Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.).p :31-195.
- **Roberts T.A. (2005).** Microorganisms in foods. *Microbial Ecology of food Commodities.* Second Edition. Springer; p: 776.
- **Ruppel P., Delfosse Ph and Hornick, J.L. (2004).** La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* p: 141-146.

- **Samson R.A., Houbraken J.Q.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M and Frisvad, J.C. (2004).** New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*. p: 45-61.
- **Sauer D.B., Storey C.L., Ecker O and Fulk D.W. (1982).** Fungi in U.S. Export wheat and corn. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*. p: 11,1449.
- **Scriban R. (1993).** *Biotechnologie*. 4^{ème} édition. *Technique de documentation- Lavoisier* (éd.). p:32-690.
- **Seo J.A., Guan Y and Yu J.H. (2003).** Suppressor Mutations Bypass the Requirement of *fluG* for Asexual Sporulation and Sterigmatocystin Production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. p:1083–1093.
- **Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M and Zid, E.D. (2005).** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (Inrat). Univ. Elmanar. Tunisie. (http://www.john-libbeyeurotext.fr/fr/revues/agro_biotech/sec/e-docs/00/04/11/2E/telecharger.md).
- **Smith John E., Moss M.O. (1985).** *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. Wiley; p :148 P.
- **Steyn P.S. (1998).** The biosynthesis of mycotoxins. *Rev Med Vet* . p:469-478.
- **Tabuc C.(2007).** Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Pathologie, Mycologie, Génétique Et Nutrition. Toulouse : L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France.p: 16-190.
- **Tantaoui E.A. (1977).** Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* du Maroc. *Homme, Terre et Eaux*. p: 79- 86.
- **Tatsadjieu N.L., Jazet Dongmo P.M., Ngassoum M.B., Etoa F-X and Mbofung C. (2009)** . Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus*. *Food Control*. p:161–166.
- **Tuomi T., Johnsson T., Hintikka E.L and Reijula K. (2001).** Detection of aflatoxins (G1–2, B1–2), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes.

- **Tuomi T., Johnsson T., Hintikka E.L., Reijula K. (2001).** Detection of aflatoxins (G1–2, B1–2), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes.
- **Ueno Y. (1977).** Trichothecenes: overview address. In J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman (ed.), *Mycotoxins in human and animal health*. Chem-Orbital, Park. Forest South, Ill. p:189-207.
- **Van der Burgt, G.J.H.M and Timmermans B.G.H. (2009).** Fusarium in wheat. Effects of soil fertility strategies and nitrogen levels on mycotoxins and seedling blight. LBL Publication.
- **Webley, D.J; Jackson, K. L; Mullins, J.D; Hocking, A.D; Pitt, J.I. (1997).** *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian Harvest. *Austr.J. Agri.Res.* p:1249-1256.
- **Weindenborner. (2000).** Whole wheat and white wheat flour; the mycobiota and potential mycotoxins. *F. Microbiol.* p:103-107.
- **Wilson D.M., Mubatanhema W and Jurjevic Z. (2002).** Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol.* p:3-17.
- **Withlow L.W and Hagler W.M. (2001).** Mycotoxin contamination of feedstuffs An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Québec.
- **Xu Xiangming., Bailey J.A and Cooke, B.M. (2003).** Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi. Springer; p:129 .
- **Yazar S., Omurtag Gulden Z. (2008).** Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in cereals. *Int. J. Mol.* p: 2062-2090.
- **Zakaria Z and Majerus P. (1992).** A rapid, sensitive and economic method for the detection, quantification and confirmation of aflatoxins. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und-Forschung* Spring-Verlag. p:316-319.
- **Zia-Ur-Rahman. (2006).** Storage effect on nutritional quality of commonly consumed cereals. *F.Chem.* p: 53-57

- **Zillinsky F.J. (1983)**. Common diseases of small grain cereals. A guide to identification. Cimmyt. p:141.

Annexe

Composition des milieux de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Dextrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7

Milieu Czapek Dox + Extrait de levure(CYA)

Sucrose	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCL	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
NaNO ₃	3 g
Extrait de levure	2 ,5g
Eau distillée	1000 ml
pH	6

Milieu Dichloran Rose Bengal (DRBC)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200g
Dextrose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	7
Rose bengal	

Coconut extract agar (CEA)

Noix de coco	334g
334g	
Eau distillée	1000ml
1000ml	
Agar	20g
20g	
pH	7

Résumés

Cereal grains form an excellent substrate for mold or fungal flora storage is a major factor of deterioration and secretion of mycotoxins. According mycological analysis of samples of durum wheat (treated and untreated).25 strains were detected of which 16 were isolated from untreated grain and 09 grain from treated.The study mycoflora analyzed grains showed that the rate of untreated wheat contamination is very high .The genus *Aspergillus* represented by different species was found in both samples analyzed with a frequency and abundance ranging from 41 to over 86% of the total flora identified on middle CDA and PDA.

The *Penicillium* and *Trichoderma* are uncommon. Finally, genera *Alternaria* , *Cladosporium* , *Rhizopus* *Ulocladium* and are less abundant in untreated wheat analyzed . Among these isolated three species of the genus *Aspergillus* mold (*Aspergillus Niger* , *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*) were selected for the production of mycotoxins. The analysis of mycotoxins produced by TLC and HPLC showed production of ochratoxin A (OTA) by *Aspergillus Niger* , aflatoxin B1 (AFB1) by *Aspergillus flavus* and gliotoxin the verruculogéne and fumagillin by *Aspergillus fumigatus*.

For the antagonism test, two strains of *Trichoderma sp* were compared in vitro with three isolates of *Aspergillus* . The growth and sporulation of three strains of *Aspergillus* were quantified by calculating the average of the diameter measurements of the colonies and the average count of spores, respectively . Our results showed a decline in growth in diameter and the number of spores of pathogenic species , compared to controls. Furthermore, the 5th day of culture,the colony of antagoniste *Trichoderma sp.* rapidly increased in size and its mycelium invaded frankly pathogenic colony. It would be interesting and useful to identify mechanisms of action and in vivo experiment to move to its wide application and save endangered crops

Key words: Durum wheat treated and untreated, Molds, Mycotoxins, TLC, HPLC

تعتبر الحبوب المادة و الركيزة الممتازة من اجل الفطريات و العفن المخزن و هي تمثل عوامل مهمة في افراز السموم. و حسب التحاليل الفطرية لعينات من القمح الصلب (المعالج و غير المعالج) تم العثور على 25 نوع فطري منها 16 فطر ظهر من خلال عينات القمح غير المعالج و 09 نوع فطري من خلال القمح المعالج.

لقد أظهرت الدراسة ان نوع الفطر *Aspergillus* والممثل باصناف متنوعة وجد بنسبة تتراوح بين 41 % و 86 % في وسط الزرع CDA و PDA الفطريات *Penicillium* و *Trichoderma* وجدت بنسبة قليلة و أخيرا الفطريات *Alternaria* و *Cladosporium* و *Ulocladium* و *Rhizopus* كانت جدا قليلة في القمح غير المعالج. من بين هذه الفطريات قمنا بعزل ثلاث أنواع من جنس *Aspergillus* و هي (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*) و تم اختيارها من اجل انتاج السموم الفطرية.

تحليل السموم الفطرية بواسطة CCM و HPLC اظهر انتاج l'ochratoxine A(OTA) من طرف *Aspergillus niger* و l'aflatoxine B1(AFB1) من طرف *Aspergillus flavus* و gliotoxine, verruculogéne , fumagilline من طرف الجنس *Aspergillus fumigatus*

من اجل اختبار التضاد المباشر antagonisme تمت مقارنة سلالتين من *Trichoderma sp* مع ثلاث اجناس من الفطر *Aspergillus*. وقد تم قياس مدى نمو و تبوغ الفطر *Aspergillus* و أظهرت النتائج التي توصلنا اليها انخفاض في قطر نمو و عدد تبوغ الجراثيم المسببة للأمراض مقارنة بالشاهد. و لحظنا بعد 5 أيام من الزرع غزو و نمو سريع ل *Trichoderma* على تثبيط الفطر *Aspergillus*

بصراحة. سيكون من المثير للاهتمام انها مفيدة لتحديد آليات العمل و التجربة في الجسم الحي للانتقال إلى تطبيق على نطاق واسع وحفظ المحاصيل المهددة بالانقراض

كلمات مفتاحية: قمح صلب معالج و غير معالج؛ سموم فطرية؛ تعفنات؛ HPLC، CCM.

Noms : MahidebMerrouche
Prénoms : NesrineHadjer

Date de soutenance : 24/06/2015

Thème : Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées à partir des grains de blé dur (traités et non traités)

Les grains de céréales forment un excellent substrat pour les moisissures ou la flore fongique de stockage constitue un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines. Selon l'analyse mycologique des échantillons de blé dur (traité et non traité). 25 souches ont été détectées dont 16 ont été isolées à partir des grains non traités et 09 à partir des grains traités. L'étude de la mycoflore des grains analysés a montré que le taux de contamination du blé non traité est très élevé. Le genre *Aspergillus* représenté par des espèces différentes a été retrouvé dans les deux échantillons analysés avec une fréquence et une abondance allant de 41 à plus de 86% de la flore totale identifiée sur milieu CEA et PDA. Les genres *Penicillium* et *Trichoderma* sont peu fréquents. Enfin, Les genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium* et *Rhizopus* sont les moins abondants dans le blé non traité analysé. Parmi ces moisissures isolées trois espèces du genre *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*) ont été sélectionnées pour la production de mycotoxines. L'analyse des mycotoxines produites par CCM et HPLC a révélé la production de l'ochratoxine A(OTA) par *Aspergillus niger*, l'aflatoxine B1(AFB1) par *Aspergillus flavus* et la gliotoxine, la verruculogène et la fumagilline par *Aspergillus fumigatus*.

Pour le test d'antagonisme, Deux souches de *Trichoderma sp* ont été confrontées in vitro à trois isolats d'*Aspergillus*. La croissance et la sporulation des trois souches d'*Aspergillus* ont été quantifiées par le calcul des moyennes des mesures du diamètre des colonies et celui des moyennes de comptage des spores, respectivement. Nos résultats ont montré une baisse du diamètre de croissance et du nombre de spores des espèces pathogènes, comparativement aux témoins. Par ailleurs, au 5ème jour de culture, la colonie de l'antagoniste *Trichoderma sp.* a rapidement augmenté de taille et son mycélium a franchement envahi la colonie des pathogènes. Il serait intéressant et utile d'en déceler les mécanismes d'action et de l'expérimenter in vivo afin de passer à sa large application et sauver les récoltes menacées.

Mots clés : Blé dur traité et non traité, Moisissures, Mycotoxines, CCM, HPLC

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM) Université Frères mentouri Constantine

