

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

**Effet biocide de *Bacillus thuringiensis* sur la flore fongique de
grains de blé tendre infesté par charançon du riz
(*Sitophilus oryzae* L.)(*Coleoptera Curculionidae*)**

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master académique en sciences
de la nature et de la vie

Spécialité : phytopharmacie appliquée

Présenté par : **BELAZIZ soumia**

Devant le jury composé de :

Mme SABRI K.	M.A.B.	U.S.D.B.	Présidente
Mme AMMAD F.	M.A.A.	U.S.D.B.	Promotrice
Mme BENSAID F.	M.A.A.	U.S.D.B.	Examinatrice
Mme DJENAS K.	M.A.A.	U.S.D.B.	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la force, la patience et le courage pour achever ce travail.

Je tiens à remercier les membres de jury de thèse d'avoir accepté d'honorer et d'enrichir mon travail. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance et mes respects.

Je tiens à exprimer ma gratitude, mes sincères remerciements, ma reconnaissance et mes respects à ma promotrice Madame AMMAD. F de m'avoir dirigée, orientée et aidée par ses précieux conseils tout le long de ce travail, sa rigueur scientifique, sa patience, ainsi que son exigence dans le travail.

Je tiens à remercier également le directeur de l'INPV de Boufarik Mr.DJEBAILI de m'avoir accepté dans le laboratoire de l'institut et j'exprime mes vifs remerciements à Madame ZITOUN. F de m'avoir dirigée au cours de mon expérimentation.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous les enseignants de notre institut surtout de la spécialité phytopharmacie.

Je remercie également mes très chère parents qui m'ont soutenue le long de mes années d'études avec amour et patience et qui ont sacrifiés de tout pour me voir heureuse et réussie, ainsi que mes trois sœurs et mes nouveaux que dieu vous garde pour moi « Inchallah ».

Je remercie également ma très chère amie Imene pour son amitié, son aide et son soutien au cours de notre travail et pour tous les moments quand a vécu ensemble durant les trois années passées.

Je remercie tous ceux que j'ai l'occasion de côtoyer au cours de ces trois années licence et master dans des sphères universitaires ou associatives mai avant tout amicale.

Je remercie également toute personne ayant contribué de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ma très très chère mère source d'affection, de courage et d'inspiration, sans qui je ne serai jamais arrivé où je suis maintenant.

Mon père, à qui je dois du respect, qui trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour tout ce qui m'a apporté.

À ma grande mère paternelle Zoulikha

À mes très chères sœurs Fatma Zahra, nadjiba et Faiza

À mes trésors neveux Manar, Fouad (alah yarahmo), Aness et Darine

À mes beaux-frères Marouane et mohamed

À mon ange Ishak

À toutes mes tantes et tous mes oncles.

À mon oncle décédé Tayeb (Rabi yarahmo)

À mes cousins et cousines surtout Sid ali, Abdeltif, Fatma Zahra et meriem.

À ma meilleure amie Imene.

À toutes mes chères amies de la spécialité phytopharmacie.

À toute la famille BELAZIZ et BOUHADIR

Pour leur présence à tout instant,

Pour leur soutien qu'ils m'ont apporté

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

RÉSUMÉ

Effet biocide de *Bacillus thuringiensis* sur la flore fongique de grains de blé tendre infesté par charançon du riz

(*Sitophilus oryzae* L.)(*Coleoptera Curculionidae*)

L'étude a porté en premier lieu sur l'isolement de la flore fongique des blé tendre infestées par le charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L) , et en seconde lieu sur l'estimation du pouvoir antifongique d'un biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* *in vitro* par deux modes d'action (activité volatile et dilution dans le milieu nutritif), sur une gamme de d'isolats de champignons phytopathogènes .

Les résultats de l'isolement au niveau de laboratoire ont révélé la présence de : deux espèces du genre *Aspergillus* (*A clavatus*, *A fumigatus* et *A flavus*) ainsi une flore accompagnatrice prédominé par le genre *Fusarium*

Les analyses liées au pouvoir antifongique ont révélé que le biopesticide présente un effet fongicide sur toute la gamme d'isolats de champignons. Les taux d'inhibition enregistré avec la technique volatile varient de 12.5% à 56% et de 9% à 52% avec la seconde mode de traitement.

Les résultats de cette étude menée a montré que la toxicité de traitement évolue avec l'augmentation de la concentration des doses appliquées d'une part, et une efficacité relativement régressive par rapport au temps (durée après traitement) qui se traduit par une faible efficacité d'autre part.

Mots clés : Céréales, Effet biopesticide, *Bacillus thuringiensis* ,charançon du riz

(*Sitophilus oryzae* , L), les moisissures des stocks.

Abstract

The study related initially to the insulation of the fungic flora of common wheat infested by the weevil of rice (*Sitophilus oryzae* L), and in second place on the estimate of the antifungal power of a biopesticide of microbial origin containing *Bacillus thuringiensis* in vitro by two modes of action (volatile activity and dilution in the nutritive medium), on a range of mushroom phytopathogenes isolates.

The analyses related to the antifungal power revealed that the biopesticide presents a fungicidal effect on all the range of mushroom isolates. The inhibition rate registered with the volatile technical vary from 12.5% to 56% and 9% to 52% with the second mode of treatment.

The results of this conducted study showed that the toxicity of treatment evolves with the increase in the concentration of the amounts applied on the one hand, and a relatively regressive effectiveness compared to the time (lasted after treatment) which results in a low effectiveness on the other hand.

Keywords: Cereals, biopesticide Effect, *Bacillus thuringiensis*, weevil of rice (*Sitophilus oryzae*), moulds of stocks.

الملخص

تأثير المضاد الطبيعي *Bacillus thuringiensis*

على مجموعة من الفطريات الممرضة لبذور القمح المخزنة

والمصابة بحشرة *Sitophilus oryzae* L

ركزت الدراسة أساسا اولا على عزل الفطريات من القمح المصاب ب (سوسة الأرز)، وثانيا تقدير قوة مبيد حيوي ذو اصل ميكروبي *Bacillus thuringiensis* وفق طريقتين الأولى تعتمد على التبخر والثانية تعتمد على التخفيف في وسط مغذي، على مجموعة من عزلات الفطريات الممرضة المتحصل عليها.

أظهرت نتائج العزل تواجد جنسين *Aspergillus et Fusarium*

كما أظهرت هذه الدراسة على أن سمية كشفت نتائج المعالجة بالمبيد الحيوي على تأثيره على كل مجموعة الفطريات المجربة تتناسب طردا مع زيادة تركيز الجرعة من جهة بنسبة تتراوح

(12.5% - 56%) بالنسبة للتبخر

(9% - 52%) التخفيف مع الوسط الغذائي بالنسبة

. لكن تم تسجيل فعالية رجعية نسبيا مع لزمن المعالجة (الوقت بعد العلاج) مما أدى إلى انخفاض كفاءة المبيد

الكلمات الرئيسية: الحبوب ، تأثير المبيدات الحيوية الفطريات الممرضة

Bacillus thuringiensis et Sitophilus oryzae L

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Première partie : Bibliographie

Chapitre I : Le blé tendre

I.1 Importance et généralité du le blé tendre..... 4

I.3.1 Description et caractères botaniques..... 6

I.4 Stockage et facteurs de détérioration des grains entreposés..... 8

Chapitre II : Le charançon du riz *Sitophilus oryzae*

II.1 Position systématique..... 15

II.4 Biologie de développement..... 16

II.5 Dégâts..... 17

II.5.1 Microflore accompagnant les grains pendant le stock..... 18

II.5.1.1 Les champignons pathogènes du blé..... 19

II.5.1.2 Les toxines fongiques..... 21

II.6 Méthodes de lutte..... 23

Chapitre III : Bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis*

III.1 Présentation du *Bacillus thuringiensis*..... 27

III.4.2 Systématique de *Bacillus thuringiensis*..... 29

III.4.5 Cycle biologique du <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
III.4.6 Mode d'action de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33

Deuxième partie : Expérimentale

Chapitre IV: matériels et méthodes.

IV.2.1 Matériel végétale, animale et microbiologique	36
IV.3 Isolement et purification de flore fongique.....	38
IV.5 Application du traitement et lecteur des résultats.....	40

Chapitre VI : résultats et discussion

Conclusion	62
-------------------------	----

Référence bibliographique

Table des matières

Annexe

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

Bt : *Bacillus thuringiensis*

BTK *Bacillus thuringiensis Kurstaki*

Cry : protéine cristale

FAO : Food and Agriculture Organization

ITGC : Institut technique des grandes cultures

PDA : Potato- Dextrose- Agar.

PI : Pourcentage d'inhibition

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Evolution de la production mondiale de blé.....	4
Figure I.2 – Evolution de la surface mondiale et des rendements mondiaux de blé.	5
Figure I.3 : Histologie du grain de blé.....	7
Figure I.4 : Différents stades de développement de blé tendre.....	8
Figure I.5 : Silos Métalliques et Silos en Bèton.....	10
Figure I.6 : Influence des températures sur le développement des ravageurs de denrées entreposées (Kodio, 1989).....	12
Figure II.1 : charançon du riz <i>Sitophilus oryzae</i> (L.).....	16
Figure II.2 : les déferlants stades de développement de <i>S. oryzae</i> : A ; L'œuf, B ; Larve, C	17
Figure II.3 : Les dégâts de <i>S. oryzae</i> adulte sur les grains de maïs.....	18
Figure III.1 : <i>Bacillus thuringiensis</i> en coupe longitudinale sous microscope électronique.....	30
Figure III.2 : A : Cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> (coupe ultrafine sous microscope électrique) B : Spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> sous microscope électronique....	30
Figure III.3 : Cristaux de Bt observés en microscopie électronique à transmission.	31
Figure III.4 : <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopie en contraste de phase ; a : spore ; b : inclusion parasporale contenant les cristaux de protéines ; c : filament	31
Figure III.5 : Cycle biologique des bactéries formant des endospores.....	32
Figure IV.1 : Echantillons des grains de blé tendre dans l'étuve	37
Figure IV.2 : Mise en culture des graines dures milieu PDA.....	38
Figure IV.3 : schéma de préparation des doses de traitement pour le test d'antagonisme.....	39
Figure V.1 : Forme macrosopique d' <i>Aspergillus flavus</i> (F2) ; <i>Aspergillus niger</i> (E5) et d' <i>Aspergillus clavatus</i> (F4).....	43
Figure V.2 : Forme macrosopique de <i>Fusarium</i> sp.....	44
Figure V.3 : Pouvoir antifongique de <i>B. thuringiensis</i> représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement.....	46
Figure V.4 :Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide d'origine microbienne à base de <i>B. thuringiensis</i> sur l'isolat fongique F2.....	47

Figure V. 5 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du biologique d'origine microbienne à base de <i>B. thuringiensis</i> sur le champignon E4.....	47
Figure V. 6 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide d'origine microbienne à base de <i>B. thuringiensis</i> sur le champignon E5.....	48
Figure V.7 : Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des 5 isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation.	49
Figure V.8 : Effet de <i>Bacillus thuringiensis</i> par l'activité volatile (durée, dose) sur les isolats fongiques.....	50
Figure V.9 : Pouvoir antifongique de <i>B. thuringiensis</i> par dilution dans le milieu gélosé représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement.....	52
Figure V.10 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du produit biologique d'origine microbienne à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le champignon F2.....	53
Figure V.11 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du produit biologique d'origine microbienne à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le champignon E5.....	54
Figure V.12 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du produit biologique d'origine microbienne à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le champignon E4.....	54
Figure V.13 : Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des 5 isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation.....	56
Figure V.14 : Effet de <i>Bacillus thuringiensis</i> par dilution dans le milieu gélosé (durée, dose) sur les isolats fongiques.....	57

Liste des tableaux

Tableau I.1: Principaux acariens et insectes des grains de céréales.....	14
Tableau II.1: Mode de conservation des principaux agents pathogènes responsables des maladies cryptogamiques du blé.....	20
Tableau II.2: Divisions des champignons ou fungi (Eumycota) principaux genres intéressant les grains et graines stockées.....	21
Tableau IV.1: Origine et date d'isolement des échantillons.....	37
Tableau VI. 1 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de produit biologique à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> avec les trois souches fongiques par l'activité volatile.....	45
Tableau VI. 2: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés.	50
Tableau VI. 3 : Résultats des tests du pouvoir antifongique par dilution dans le milieu gélosé.....	51
Tableau VI. 4: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés pour le mode d'action dilution dans le milieu gélosé.....	56

Introduction générale

Introduction

Les céréales comme le blé, l'orge, le maïs, le sorgho, ont, de tout temps, constitué la principale ressource alimentaire dans le monde (Bushuk et Lee, 1978). La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréaliennes (Bonjean et Picard, 1990).

D'une manière générale, les pertes dues aux insectes, aux pathogènes et aux mauvaises herbes correspondent à 35% de la production agricole, si l'on ajoute les pertes après la récolte, on estime à 45% les pertes causées par ces ravageurs et micro-organismes (Vincent et Coderre, 2002).

A l'échelle mondiale, les pertes des céréales en stocks, pourraient atteindre 15-20% de la production totale. Ces pourcentages de pertes sont très variables selon les régions voire les pays; faibles dans les pays industrialisés, elles avoisinent les 3%, par contre dans les pays en voie de développement elles sont très élevées et peuvent atteindre de 20-30% (Bulot, 1990).

Plusieurs agents de détérioration sont responsables de ces pertes. Les plus importants sont les insectes (44%), les rongeurs (30%) et les champignons (26%) (Foua-Bi, 1989). Des études ont montré que les pertes dues aux organismes nuisibles, au cours du stockage, varient entre 1 et 50% de la production (Kodio, 1989).

L'Algérie n'échappe pas à ce problème où les dégâts provoqués seulement par les insectes dépassent de loin les 33% en période d'été, (température optimale de développement des insectes) (Mebarkia et Guechi.,2006)

Les insectes représentent donc, une cause importante d'altération des récoltes vivrières, soit par la consommation directe des réserves alimentaires stockées, soit par la dégradation de leur qualité nutritive (Jacobsan et Thomas, 1981), soit enfin par les souillures de différentes origines (Khare et al, 1974).

Il est cependant indispensable de prévenir et de gérer l'infestation des cultures par les ravageurs et l'infection par les maladies de manière à améliorer les productions et les rentabiliser. Cette alternative implique un besoin accru de méthodes de protection des plantes plus en plus performantes, du fait que la protection des cultures est une composante essentielle de l'agriculture.

Au cours des dernières années, la lutte chimique a été largement appliquée dans le domaine des maladies et des ravageurs en raison de son efficacité et son application facile et pratique, mais son application n'a jamais apporté une solution durable. Malheureusement, les producteurs ne s'appuient quasiment que sur la lutte chimique pour faire face aux bioagresseurs (Kouassi, Thakore 2006).

Cependant, suite à l'emploi abusif des pesticides de synthèses, il s'est avéré que des perturbations sont apparues à différents niveaux, non seulement environnementaux, mais également sur la santé humaine.

La prise en conscience des limites des méthodes chimiques comme un moyen efficace pour résoudre les problèmes des maladies des plantes a incité les chercheurs à s'orienter vers la lutte biologique. Ce moyen de lutte met en œuvre des organismes vivants ou des substances biologiques pour réduire les dégâts causés par les agents phytopathogènes (Jensen et *al.*, 1996).

En effet, une orientation vers la lutte biologique et les biopesticides est en cours ces dernières années du fait qu'ils constituent des outils facilitant l'implantation de programmes de lutte offrant un équilibre plus acceptable entre le besoin impératif de protéger les cultures et le respect des exigences écologiques.

Dans le cadre de l'utilisation des biopesticides, les microorganismes endophytes des plantes constituent une approche intéressante du fait que ces derniers sont habitants normaux de la plante.

Par ailleurs Peu d'études se sont intéressées à l'importance relative des différentes souches de champignons accompagnent les grains infester par les espèces d'insectes dans les denrées rencontrées sur nos lieux de stockage en Algérie.

Nous nous sommes donc intéressés à cette microflore qui accompagne les ravageurs nuisibles aux céréales notre intérêt n'ayant porté ver le blé tendre (*Triticum eastivum*).

Notre étude a été dirigée dans le sens a inventorié et lutté contre les champignons qui accompagne les grains de blé tendre infesté par charançon du riz

Sitophilus oryzae de trois régions Médéa, Guelma, Tiaret par l'utilisation de produit biologique d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis*.

PARTIE I
BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I

Données générales sur le blé tendre

I.1. Importance du blé dans le monde :

Le blé est l'une des principales ressources alimentaires de l'humanité du fait qu'il comprend une protéine particulière aux caractéristiques plastiques qui est le gluten, celui-ci permet la fabrication d'une gamme très variée de produits : pain, biscuit, pâtes alimentaires (Alane et Khalfaoui ,2005).

La production mondiale de blé fut en croissance constante durant les cinquante dernières années et s'élève pour la campagne 2010-2011 à 691,5 millions de tonnes soit trois fois plus que pour la campagne 1960-1961 (Figure I.1) (Terrons Gaviva et Burny, 2012).

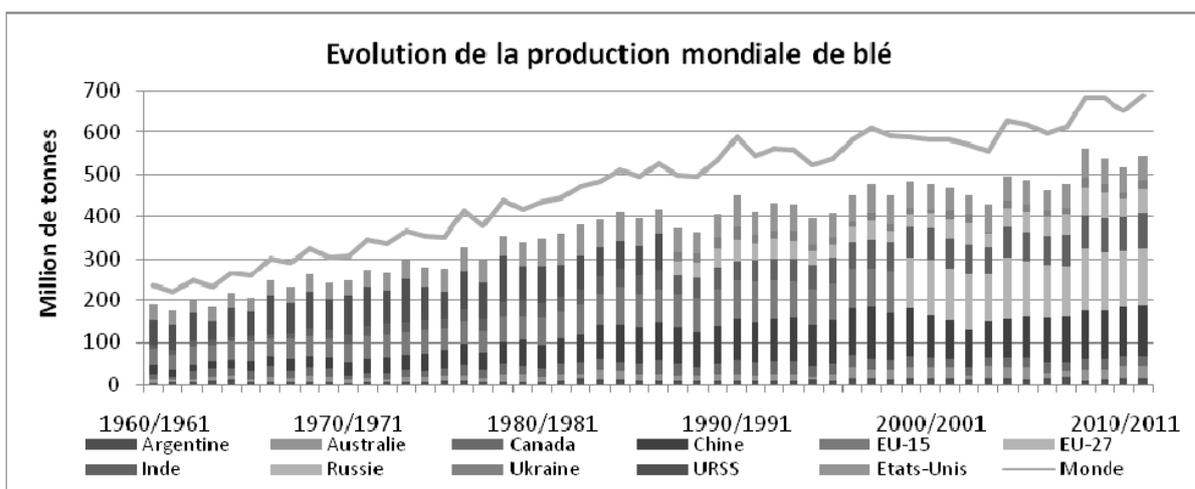


Figure I.1. Evolution de la production mondiale de blé (Terrons Gaviva et Burny, 2012).

Cette hausse de la production de blé est principalement due à une augmentation constante des rendements à l'hectare (multiplié par 2,8 sur les cinquante dernières années) plutôt qu'à une augmentation des surfaces mondiales cultivées en blé. En effet, le nombre d'hectares cultivés en blé, après avoir connu une augmentation jusqu'en 1981 (239,2 millions d'hectares de blé), n'a pas cessé de diminuer pour atteindre 216,8 millions d'hectares en 2010 (Figure I.2) (Terrons Gaviva et Burny, 2012).

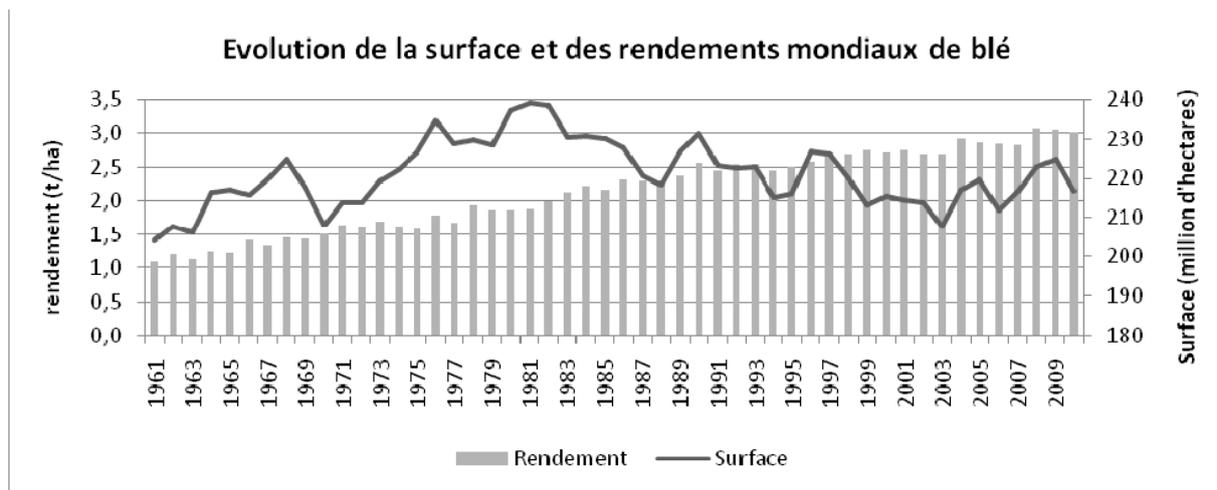


Figure I.2. Evolution de la surface mondiale et des rendements mondiaux de blé (source des données de base : FAO) (Terrons Gaviva et Burny, 2012).

I.2. Importance du blé en Algérie:

Les céréales et leurs dérivés représentent un élément stratégique dans le système alimentaire algérien, en effet, 80 pourcent de la superficie agricole est occupé par la production céréalière (Doumandji et al., 2003).

L'Algérie appartient au groupe des plus gros importateurs de blé dans le monde, où elle est classée à la sixième place (Kellou, 2008). La production nationale est faible et ne permet de satisfaire qu'environ 35 % des besoins d'une population de plus en plus croissante et le recours aux importations a placé l'Algérie parmi les premiers pays importateurs de blé (Saraoui, 2011).

I.3. Généralités sur le blé tendre (*Triticum sp*)

Les céréales sont des plantes herbacées, monocotylédones appartenant à la famille des graminées et donnant des grains farineux propres à l'alimentation de l'homme et des animaux domestiques (Dumont, 1986).

En Algérie deux variétés dominent la production céréalière ; le blé tendre et le blé dur. Plusieurs autres espèces existent cependant, certaines sont cultivées sur des superficies plus réduites (l'orge, l'avoine, le maïs et le sorgho) (Anonyme, 2005).

Les achats de blé tendre, qui représentent une part importante des importations algériennes, sont passées à 1,88 milliard de dollars pour une quantité de 5,26 millions de tonnes durant les onze premiers mois de 2011, contre 794,52 millions de

dollars pour 3,62 millions de tonnes, en hausse de plus de 137 % en terme de valeur (Anonyme, 2005).

I.3.1. Description et caractères botanique du blé tendre

I.3.1.1. Position systématique du blé tendre

D'après Chadeaud et Emberger (1960), Prats (1960) et Feillet (2000), la position taxonomique du blé tendre est la suivante :

Règne: *Plantae* (Règne végétale)
Division *Magnoliophyta* (Angiospermes)
Classe: *Liliopsida* (Monocotylédones)
S/ Classe: *Commelinidae*
Ordre: *Poale*
Famille: *Poaceae* (ex : Graminées)
S/ Famille: Triticeae
Tribu: Triticinae (Triticées)
S/Tribu: Triticinae
Genre: *Triticum*
Espèce: ***Triticum aestivum L / Triticum vulgare***

I.3.1.2. Composition du grain du blé

Le grain de blé est constitué de 3 grandes parties : le germe, l'albumen et les enveloppes (Figure I.3). Il est constitué majoritairement d'amidon qui représente environ 70% de la matière sèche du grain et qui est situé dans l'albumen. Les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus du grain de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (Pomeranz, 1988). Les pentosanes (polysaccharides non amylicés) représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80%) (Climent, 2010).

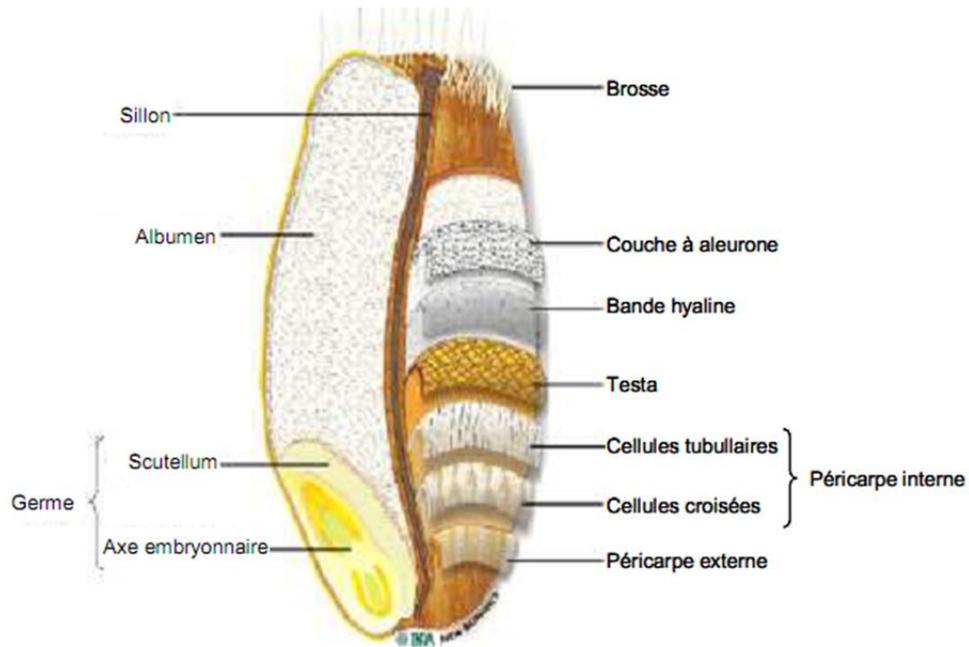


Figure I.3 : Histologie du grain de blé (Surget et Barron, 2005).

I.3.1.3. Cycle biologique du blé tendre :

Le cycle biologique de blé tendre comprend trois phases végétatives qui sont les suivantes :

- Phase de germination –levée
- Phase de levée –tallage
- Phase de montaison comprend (phase d'épiaison- floraison et phase de développement et de maturation du grain (Figure I.4).

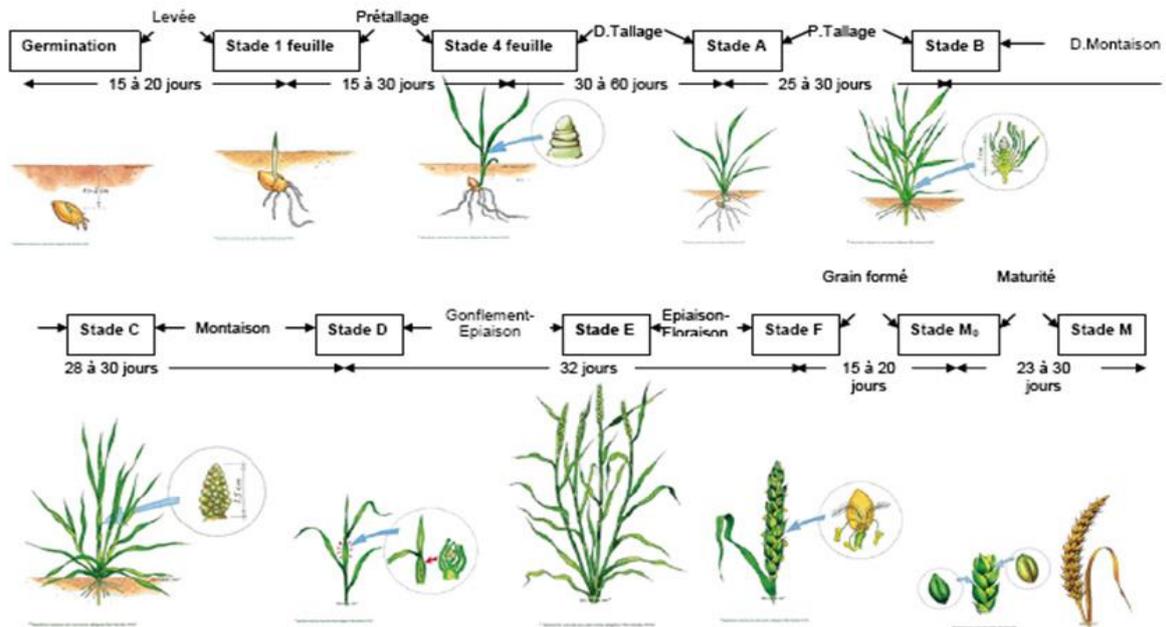


Figure I.4 : Différents stades de développement de blé tendre (Soltner, 2005)

I.4. Stockage des grains

Selon Agrawal(1992), Le stockage des graines est une opération importante et doit commencer au champ, lorsque les semences ont atteint leur maturité physiologique qui dépend énormément des facteurs abiotiques, telles que l'humidité et la température. Il est difficile d'éviter une baisse de viabilité des semences au cours de l'entreposage ou stockage .Cependant, l'entreposage devrait permettre de minimiser la perte de viabilité et de vigueur des semences

D'après le même auteur, il existe trois types d'entreposage :

- L'entreposage de la semence à partir de la récolte jusqu'au prochain semis (à court terme : 6 à 8 mois).
- L'entreposage des excédents de récolte (à moyen terme : habituellement de 12 à 14 mois)
- L'entreposage des germoplasmes, des semences de l'améliorateur et des échantillons destinés aux essais de laboratoire (à long terme : de 5 à 20 ans)

I.4 .1. Les moyens de stockage

Les moyens de stockage doivent être soigneusement choisis. Le site de stockage doit être aussi sélectionné, dans une région où et une forte humidité relative et forte température ne coïncident pas.

I.4 .1.1. Le stockage traditionnel du blé

Le paysan algérien par exemple, sur les Hauts plateaux, conservait tant bien que mal, le produit de ses champs d'orge et de blé dans des enceintes creusées dans un sol argileux généralement à un endroit surélevé ou proche de la ferme. C'est ce qu'on appelle « El-matmoura ». La capacité de ces lieux de stockage est variable, elle est de l'ordre de quelques mètres cubes (Doumandji et *al.*, 2003).

C'est une technique archaïque peut être encore utilisée dans certains régions isolées. L'inconvénient majeur de cette dernière, c'est la trop forte humidité et les eaux d'infiltration qui favorisent le développement des moisissures et les phénomènes de fermentation bactérienne (Doumandji et *al.*, 2003).

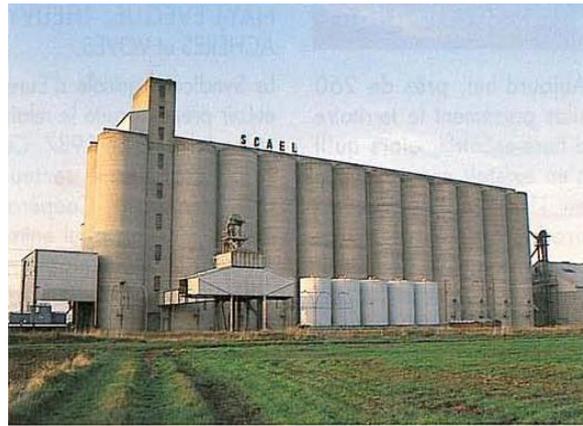
I.4 .1.2 Autres méthodes de stockage peu fréquent actuellement

Parmi les méthodes de stockage les plus utilisés actuellement nous citons :

- Le stockage en gerbes.
- Le stockage en épis.
- Le stockage des grains avec leurs balles.
- Le stockage en sac du blé.
- Le stockage du blé en vrac.
- Le stockage du blé en silo (figure I.5)
 - Les silos en métal.
 - Les silos en béton (Appert, 1985).



Silos Métalliques



Silos en Bèton

Figure I.5:les silos de stockage (Métidj,enquête 2006 ;In Kellou ,2008)

I.5. Facteurs de détérioration des grains entreposés :

En stock, les grains constituent un ensemble d'être vivants en étroite association et en constante évolution .La plupart des mécanismes d'altération de grains pouvant intervenir pendant le stockage. Le déclenchement d'un mécanisme particulier nécessite la présence simultanée de causes d'altération et de facteurs au maintien de ces causes (Kossou et Ahon, 1993).

I.5.1. Les facteurs abiotiques

Pendant le stockage la graine est à l'état de vie ralentie et peut donc germer dans certaines conditions de température, d'humidité et l'entreposage des grains de céréale pour une durée plus ou moins longue. Plusieurs facteurs d'altération peuvent être à l'origine des pertes considérables, la viabilité de la semence est influencée par plusieurs facteurs dont les principaux sont :

I.5.1.1. La durée de stockage

Le facteur temps favorise l'installation d'une ou de plusieurs causes intrinsèques ou extrinsèques d'altération des grains. Ces causes peuvent être de nature biologique ou physico-chimique. En effet, un temps prolongé de stockage peut, d'une part, favoriser la création d'une zone propice à l'altération et à l'évolution de certaines espèces à cycle court et affecter la vigueur de la graine (Cangardel, 1978).

I.5.1.2. L'humidité

Parmi les facteurs qui influencent l'évolution des blés, l'humidité est certainement le facteur le plus important puisqu'une augmentation de la teneur en eau du produit permettra d'engendrer un milieu propice aux altérations d'ordre chimique et enzymatique. Elle joue également un rôle important dans le développement des déprédateurs des blés (Fleurat Lessard, 1982).

Selon Appert (1985), un grain sec est à l'état de vie ralentie et ses échanges avec l'atmosphère sont très réduits par contre le métabolisme des grains, s'élève au fur et à mesure que la teneur en eau augmente, il devient alors un milieu propice aux altérations d'ordre chimiques, enzymatiques et biologiques.

I.5.1.3. La température

Les grains sont des mauvais conducteurs thermiques et toute élévation de température engendrent un transfert de chaleur et de vapeur d'eau de la zone la plus chaude vers la zone froide (Gough et Uisoc, 1987).

La détérioration touche principalement les processus biochimique et enzymatique, et toutes les altérations sont d'autant plus rapide, que la température est élevée (Appert, 1985).

Il est à noter que la température seule peut agir sur le taux de croissance des ravageurs de denrées stockées. Pour chaque espèce, il existe un optimum de développement et des degrés différents de tolérance thermique. Les insectes les plus nuisibles ont, pour leur développement, un optimum de 28°C et un minimum de 15°C (Figure I.6) (Lepesme, 1944).

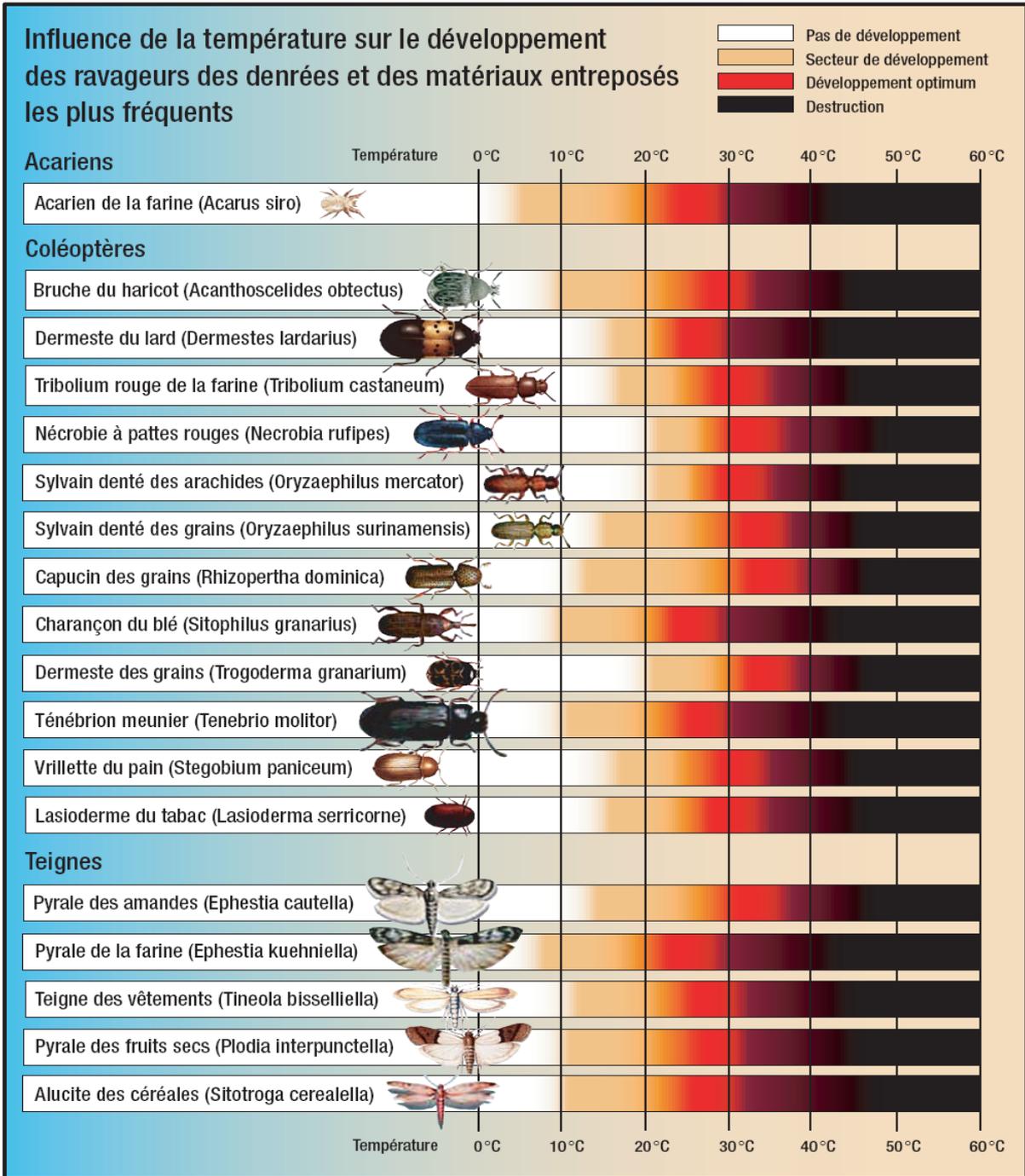


Figure I.6 : Influence des températures sur le développement des ravageurs de denrées entreposées (Kodio, 1989)

I.5.1.4. Les altérations mécaniques

Ils sont dus à des chocs provoquant des cassures lors des différentes opérations de manutention qui favorisent d'autres altérations et notamment le développement des insectes et micro-organisme (Cheftel et Cheftel, 1977).

I.5.2. Les facteurs biotiques

I.5.1.1. Les altérations biochimiques

Les agressions d'origine biochimique sont très variées, celle-ci conduisent aux accidents d'échauffement biologique, qui se traduit par des changements au niveau des propriétés fonctionnelles des protéines des produits de mouture stockés; qui perdent leur solubilité, leurs activités enzymatiques par la dénaturation des protéines (Glastone ,1960).

2.5.2.2. Les altérations dues aux moisissures

Les moisissures sont toujours présentes sur les grains. Elles se développent au champ, ou au cours du stockage (Guiraud, 1998).Cependant la colonisation des grains par les moisissures peut entraîner, suivant la durée de conservation et les conditions du milieu de stockage, divers types de dégâts : perte de germination, décoloration, production de mycotoxines,.....ect.

De plus, le développement des moisissures favorise la pullulation des acariens mycophages, responsables de nombreux problème d'allergies (Kossou et Ahon, 1993).

2.5.2.3. Les altérations dues aux ravageurs

Parmi les déprédateurs des céréales stockées, les acariens, les insectes (coléoptère, lépidoptère) et les vertébrés (oiseaux et les rongeurs sont les plus importants).

2.5.2.3.1. Principaux insectes des céréales stockées

Les insectes ravageurs du grain se développent encore jusqu'à des teneurs en eau de l'ordre de 10% dans les céréales, c'est-à-dire que dans tous les cas de stockage, ils vont représenter un risque (Fleurat Lessard, 1996).

L'ensemble de ces espèces fait partie de deux ordres principaux: les coléoptères et les lépidoptères (Tableau I.1). Ce sont des insectes à métamorphose complète ; c'est ainsi qu'après l'éclosion de l'œuf, ils passent par trois stades : le stade larvaire, le stade nymphal et enfin le stade adulte.

Tableau I.1: Principaux acariens et insectes des grains de céréales (Scotti, 1984)

Ordre	Nom scientifique de l'espèce	Nom commun de l'espèce
Insectes	<i>Sitophilus granarius</i> (L.)	Charançon ou calandre du grain de blé
Coléoptères	<i>Sitophilus oryzae</i> (L.)	Charançon ou calandre du riz
	<i>Tribolium castaneum</i> (Herbest.)	Tribolium rouge de la farine
	<i>Tribolium confusum</i> (Duval.)	Tribolium brun de la farine
	<i>Oryzaephilus surinamensis</i> (L.)	silvain
	<i>Ahasverus advena</i> (Waltl.)	
	<i>Cryptolestes ferrugineus</i> (Steph.)	
	<i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)	Capucin du grain
	<i>Trogoderma granarium</i> (Everts .)	Dermeste des grains Cadelle
	<i>Tenebrio molitor</i> (L.)	
Lépidoptères	<i>Plodia interpunctella</i> (Hübner.)	Teigne des fruits secs
	<i>Sitotrogace realla</i> (Olivier.)	Alucite des céréales
	<i>Nemapogon granella</i>	Teigne des grains
	<i>Ephesia kuehniella</i> (Zell.)	Teigne de la farine
	<i>Pyralis farinalis</i>	Pyrale de la farine
Psocoptères	<i>Liposcelis divinatorius</i> (Müll.)	Pou des livres
Acariens	<i>Acarus siro</i>	Tyroglyphe de la farine
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Acarien du colza
	<i>Glycyphagus destructor</i>	Acarien chevelu
	<i>Cheyletus eruditus</i> (Schrank.)	Cheylete cannibale
	<i>Melichares tarsalis</i>	

CHAPITRE II

**Présentation du ravageur
charançon du riz (*Sitophilus
oryzae* L.) et maladies de blé**

II. Présentation du ravageur charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L.).

II.1. La position systématique

D'après Lepesme (1944), cet insecte est un petit Coléoptère appartenant au genre *Sitophilus* et à la famille de Curculionidae. Anciennement connu sous le nom de *Calandra* il est maintenant, communément appelé charançon des grains.

D'après Borror (1981), la position systématique de *Sitophilus oryzae* (L), est la suivante.

- Embranchement : *Arthropodes*
- S/ Embranchement : *Antennates*
- Classe: *Insectes*
- Sous-classe : *Ptérygotes*
- Super-ordre : *Coléoptéroïdes*
- Ordre : *Coléoptères*
- Sous-ordre : *Polyphaga*
- Super-famille : *Phytophagoidea*
- Famille : *Curculionidae*
- Sous-famille : *Rhynchophorinae*
- Genre : *Sitophilus*
- Espèce : *Sitophilus oryzae.L*

II.2. Répartition géographique :

Les *Sitophilus* sont devenus cosmopolites, suite à l'accroissement des échanges internationaux et à la nécessité de stocker des quantités considérables de grains, ce qui a permis aux charançons et aux autres déprédateurs d'envahir les différents continents (Fourar ,1994).

II.3. Description morphologique :

Comme tous les charançons, il se caractérise par la forme de sa tête prolongée par un tube cylindrique appelé rostre. Ce rostre est finement ponctué et porte, à son extrémité, des pièces buccales broyeuses. Il porte aussi des antennes coudées, généralement formées de huit articles et terminées en massue (Lacoste, 1970 ;

Fleurat- Lessard, 1982).Le prothorax recouvert de piqûres rondes ou irrégulières; présence d'ailes postérieures. (Anonyme ,2009) (Figure II.1).



Figure II.1: charançon du riz *Sitophilus oryzae* (L.) (Anonyme, 2009)

II.4. Biologie de développement

II.4.1.Conditions de développement

Les conditions du milieu influent de façon nette sur la dynamique des populations. Selon Steffan (1978), les charançons sont très sensibles à la sécheresse ; les conditions optimales pour leur croissance sont représentées par une température de 28°C et une humidité relative de 70%.

Le développement de l'insecte se fait à l'intérieur du grain ; avec son rostre, la femelle fait un trou dans un grain, y dépose un œuf puis rebouche le trou par du mucilage qui va durcir à l'air. Dès qu'elle apparaît, la larve creuse, au travers du grain, une galerie qu'elle va élargir au fur et à mesure de sa croissance ; elle se transformera ensuite en nymphe dans la loge qu'elle aura créée puis deviendra, après une dernière mue, un adulte qui sortira alors du grain pour se reproduire.

II.4.2. Le cycle vital de *S. oryzae*

Le cycle vital de *S.oryzae* comporte quatre stades : l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago (Figure II.2).

- **Œuf** : piriforme, blanc brillant et mesure d'après 0,65 à 0,70 mm (Lepesme, 1944).
- **Larve**: blanche, sub-circulaire, apode, très peu velue; quatre stades larvaires. A maturité, la larve mesure de 2.5 à 3 mm de long (Alex et Maurice, 1993) .

- **nymphe:** morphologiquement identique à l'adulte, reste repliée (Mathlein , 1938).
- **Adulte :** est de longueur variant entre 2,3 et 3,5 mm, de couleur brun foncé au noir et le corps à l'aspect mat avec deux taches fauves sur chaque élytre (Multon, 1982).

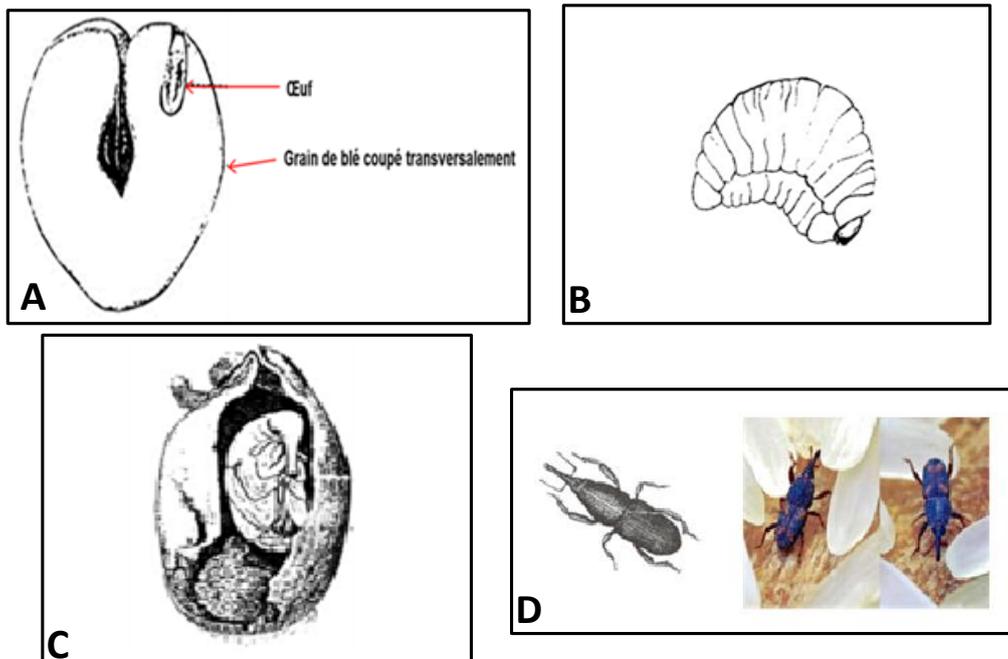


Figure II.2 : les différents stades de développement de *S. oryzae* : A ; L'œuf, B ; Larve, C ; Nymphe, D ; Adulte (In Acta, 1982).(Anonyme, 1982).

II.5. Dégât :

C'est la larve du *S. oryzae* qui est responsable principalement des pertes pondérales, puisque elle se développe aux dépens des réserves des grains, en dévorant aussi bien le germe que l'albumen ne laissant que l'enveloppe perforée (Kranz et al ,1977). Durant leur vie, elles consomment la moitié ou le tiers de l'endosperme d'un grain de blé (Blachowsky et Mesnil ,1936).

Il favorise aussi l'installation des champignons qui détériorent la qualité du grain, en plus ces derniers créent un terrain favorable aux insectes secondaires et au microorganisme qui accentuent les dégâts des prédateurs primaires (Kranz et al ,1981).

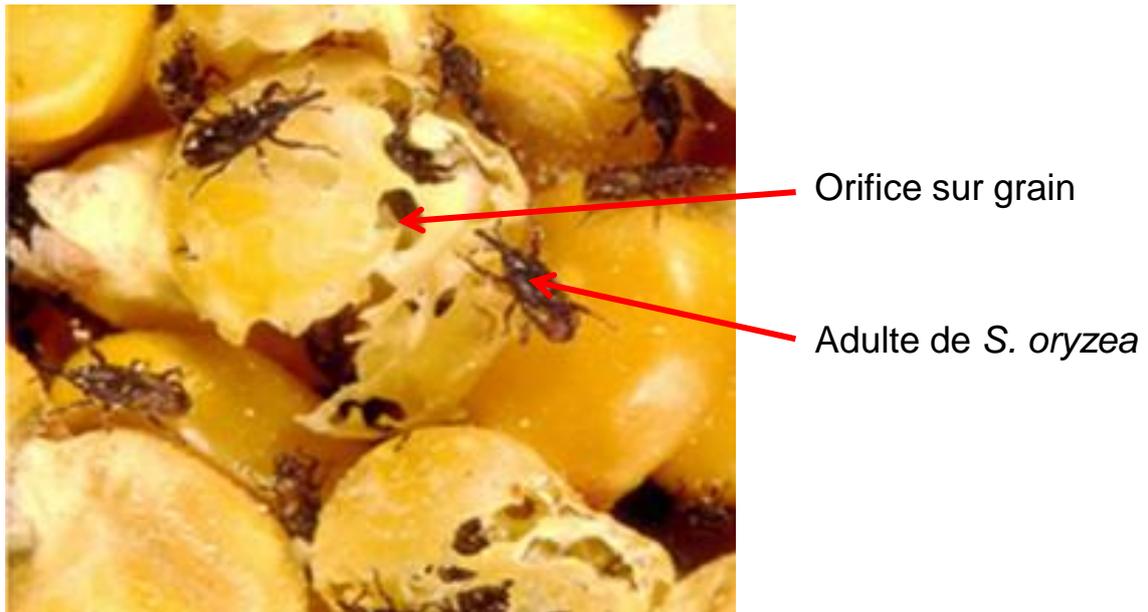


Figure II.3 : Les dégâts de *S. oryzae* adulte sur les grains de maïs (Benazzedine, 2010)

II.5.1. Microflore accompagnant les grains pendant le stock

Selon Multon(1982), la microflore des grains et graines est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. A la récolte, la flore des grains et graines compte de très nombreux genres de bactéries, de moisissures, de levures et d'actinomycètes.

Le nombre de bactéries peut atteindre plusieurs millions par gramme sur les grains fraîchement récoltés. La population bactérienne est essentiellement constituée par eubactéries qui renferment une très forte proportion d'Entérobactéries, notamment de coliformes pigmentés ou « bactéries jaunes », toujours abondantes sur les céréales (Multon, 1982).

Les moisissures sont représentées par des espèces très variées, les plus répandues appartenant aux genres : *Altenaria*, *Cladosporium*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* et *Aspergillus*. Ces deux derniers genres ne se trouvent qu'en faible proportion sur les grains et graines à la récolte, mais adaptés aux substrats relativement secs, ils peuvent prendre leur essor au cours de stockage, alors que les autres espèces, plus hydrophiles, se multiplient moins activement ou régressent. Ces observations ont permis de classer les espèces fongiques céréalières en mycoflore du champ et mycoflore du stockage (Multon, 1982).

Les levures, bien qu'étant une composante habituelle de la microflore des grains, ont été peu étudiées. Il en est de même des actinomycètes, dont la distribution est très irrégulière et qui peuvent être aussi bien abondants que presque totalement absents (Multon, 1982).

Les origines du peuplement microbien sont multiples. Une grande partie des éléments qui le composent proviennent de la plante sur pied : c'est ainsi que des plantes fusariées peuvent donner des grains riches en *Fusarium*, et que la mycoflore dite « des champs » est parfois à tendance parasitaire (Multon, 1982).

II.5.1.1. Les champignons pathogènes du blé

En absence de la plante hôte les champignons responsables des maladies du blé se conservent dans différents supports comme la semence, les débris et le sol (tableau II.1). Le mode de conservation est important à connaître, puisqu'il détermine, en partie la stratégie de lutte à adopter.

On distingue les maladies transmises par les semences et les maladies foliaires, dont les substrats de conservation sont variables (sol, chaumes à la surface du sol).

Les maladies transmises par les semences ont essentiellement les charbons et les caries. Le degré d'infestation d'un champ par ces agents pathogènes est directement lié à l'état sanitaire de la semence (Brahimi, 2001).

Tableau II.1: Mode de conservation des principaux agents pathogènes responsables des maladies cryptogamiques du blé (Brahimi, 2001).

Mode de conservation	Agent pathogène	Maladie
sol	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Cochliobolus sativus</i>	Pourriture racinaire
	<i>Urocystis agropirii</i>	Charbon foliaire
Semence	<i>Ustilago nuda</i>	Charbon nu
	<i>Tilletia caries</i>	carie
	<i>Septoria caries</i>	Septoriose des épis (Glume Blotch)
Chaumes	<i>Erysiphe graminis f. sp. tritici</i>	Oidium
	<i>Septoria tritici</i>	Septoriose des feuilles (Leaf Blotch)
	<i>Septoria nodorum</i>	Septoriose des épis (Glume Blotch)
	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Tache bronzée
Chaume + hôtes alternatives	<i>Puccinia tricina</i>	Rouille brune
Repousses des plantes hôtes	<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i>	Rouille noire
	<i>Puccinia striiformis</i>	Rouille jaune

D'après le tableau II.2 la plupart des genres rentrés sur les grains et graines en conservation ne se multiplient que par voie asexuée et on ne leur connaît pas de reproduction sexuée. Pour cette raison les moisissures sont dites « imparfaites » et classées dans les Deutéromycètes ou Fungi imperfecti (Multon, 1982).

Tableau II.2: Divisions des champignons ou fungi (Eumycota) principaux genres intéressant les grains et graines stockées (Multon, 1982).

	ordres	Principaux genres
Zygomycètes	Mucorales	<i>Absidia, Actinomucor, Mucor, Rhizopus.</i>
Endomycètes (levures)	Endomycetales torulopsidales	Sccharomyces, Hansenula, Pchia. Torulopsis, Aureobasidium, <i>Candida</i>
ascomycètes	eurotiales	<i>Monascus, Byssochlamys, Eurotium.</i>
basidiomycètes	Ustilaginales* Tillétiales*	Ustilago tilletia
Deuteromycètes ou Fungi imperfecti	Hyphales Shaeropsidales*	<i>Aspergillus, Penicillium, Wallemia, Ggeotrichum, Sporendonema, Trichothecium, Paecilomyces, Trichoderma, Verticillium, Cladosporium, Scopulariopsis, Stemphylium, Helminthosporium, Alternaria, fusarium. Septoria, Phoma</i>
*Micromycètes parasites des céréales, transmis par les semences, mais sans incidences connues lors du stockage.		

II.5.1.2. Classement et caractéristiques chimiques des toxines fongiques susceptibles d'être produites dans les grains et graines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires élaborés par plusieurs souches de champignons à certains stades de leur développement. Elles ne jouent

apparemment pas de rôle déterminant dans la vie des espèces productrices, qui ne diffèrent des souches non productrices ni par leur aspect ni par leurs caractéristiques de croissance (Multon 1982).

La présence éventuelle de mycotoxines dans les aliments constitue désormais un des aspects importants de la toxicologie alimentaire, le risque qui en découle est l'industrialisation des techniques d'élevage a permis d'associer de façon précise la consommation de produits moisissés à l'apparition de syndromes pathologiques.

Sept groupes de toxines qui, à notre avis, posent les problèmes les plus importants au cours de la conservation des céréales (Multon 1982).

a- Les aflatoxines

Ces des mycotoxines produites par deux souches mycéliennes extrêmement voisines : *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Elles sont stables au cours d'un stockage prolongé, les produits contaminés conservent leurs contaminations intactes pendant plusieurs années. Par contre, elles se dégradent rapidement en milieu alcalin. Elles absorbent la lumière vers 350 nm (Multon, 1982).

b- Les époxytrichothécènes

Les contaminations par ce type de toxine tel que les trichothécènes peuvent avoir des conséquences multiples tant pour des consommateurs humains que pour du bétail (Multon, 1982), ne sont détruits ni au cours de opérations de stockages, même prolongées, ni au cours des préparations culinaires et des modalités de cuisson auxquelles les céréales sont soumises (Multon, 1982).

c- La zéaralénone

La zéaralénone est un métabolite synthétisé par des moisissures appartenant au genre *Fusarium* contaminant les céréales au cours de leur stockage, il ne s'agit pas d'une toxine au sens strict du terme, mais son action œstrogène peut provoquer des perturbations physiopathologiques graves (Multon, 1982).

d- Les ochratoxines

Bien qu'elle aient d'abord été caractérisées comme métabolites d'*Aspergillus ochraceus*, d'où leur nom les ochratoxines sont synthétisées par au moins 7 souches d'*Aspergillus* : *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A.*

petrakii, *A. sclerotium* et *A. sulfureus* et 6 souche de *Penicillium* : *P. viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. commune*, *P. palitans*, *P. purpurescens* et *P. variable*. (Multon, 1982). Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau et insolubles dans les éthers de pétrole et les carbures saturés.

Elles se dégradent en milieu alcalin, stables à la chaleur et résistent aux procédés de cuisson et de stérilisation utilisées en pratique culinaire (Multon, 1982).

e- La citrinine

La citrinine est produite par au moins 14 espèces de *Penicillium citrinum* et d'*Aspergillus*. Le principal producteur dans les céréales apparaît être *P. viridicatum* (Multon, 1982).

Elle est thermosensible, stable en milieu acide, mais est instable en milieu alcalin. Elle se dégrade spontanément au cours du stockage des céréales, spécialement en présence d'une haute activité d'eau (Multon, 1982).

f- La patuline

La patuline a été isolée à partir des cultures de *Penicillium patulum* (J.H. Birkinshaw et al 1943 in Multon 1982), elle a un pouvoir cancérigène une fois injectée par voie sous-cutanée. Sa présence dans les céréales est cependant suffisamment rare pour qu'elle puisse poser à ce niveau de problème majeur (Multon, 1982).

g- La stérigmatocystine

Elle est produite avec un rendement pouvant largement dépasser 1g/kg par culture d' *Aspergillus. Versicolor* sur un milieu solide à base de maïs, mais peut être également synthétisée, en moindre quantité, par une dizaine d'espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Chaetomium*. Elle peut être accompagnée d'un grand nombre de métabolites voisins (Multon, 1982).

II.6. Méthodes de lutte

La protection des céréales stockées contre les attaques d'insectes et d'acariens soulève des problèmes variés et elle doit faire appel à un ensemble de techniques différentes qu'il est nécessaire d'appliquer à bon escient.

II.6.1. Lutte chimique

Depuis la venue des composés organiques de synthèse, on regroupe les insecticides en insecticides organiques (les organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes représentent les grandes majorités des insecticides organiques de synthèse qui ont été employés ou sont utilisés actuellement) (Regnault et Philogene, 2005), et inorganiques (généralement à base d'arsenic ou de fluosilice, ils sont aujourd'hui prohibés).

Largement répandue, en raison de son efficacité, elle doit être appliquée avec discernement pour limiter les risques qu'elle peut faire courir aux consommateurs des denrées. Malheureusement ces produits phytosanitaires ont des effets négatifs sur l'homme et l'environnement. Deux types de traitement sont généralement employés : traitement par contact et par fumigation (El lakwah, , 1990).

II.6.2. Lutte physique et mécanique

Elles concernent toutes les techniques mécano-thérapeutiques susceptibles de rendre le stock sain. En général, ces techniques ne sont pas efficaces contre les formes cachées. Elles sont recommandées pour pallier aux problèmes des résidus chimiques liés aux différents traitements chimiques appliqués aux denrées stockées.

II.6.3. La lutte génétique :

Ce moyen de lutte alternatif envisage l'utilisation de plantes génétiquement modifiées permettant d'introduire une résistance à une ou plusieurs maladies en exprimant des gènes de défense issus d'autres organismes ou en sur-exprimant les gènes de défenses déjà existants (Gilbert et *al.*, 2006).

II.6.4. Lutte biologique

Il existe plusieurs solutions pour remplacer de la lutte chimique. La lutte biologique est une approche qui semble rallier de plus en plus de producteur et de recherche scientifiques (Silvy, et Riba, 1999).

La lutte biologique correspond à l'utilisation d'organismes et/ou composés naturels pour détruire ou contrôler d'autres organismes nuisibles sur le plan agronomique ou au niveau d'espaces naturels. Ces agents sont regroupés sous l'appellation de « biopesticides ». On distingue des organismes prédateurs (insectes, nématodes, plantes, mammifères, etc....) mais également des protistes (bactéries, virus, champignons) ou des molécules naturelles (phéromones, roténones, etc....) A partir des biopesticides d'origine botanique on trouve Les huiles essentielles (Silvy et Riba, 1999).

II.6.4.1. Biopesticides

Un biopesticide d'origine microbienne est un organisme comme une bactérie, un virus, un champignon ou un protozoaire, utilisé pour contrôler une maladie ou un ravageur. La littérature rapporte de nombreux travaux réalisés à travers le monde en plein champ et sous serre pour le contrôle d'un certain nombre de maladies causées par des pathogènes telluriques, foliaires ou de post-récoltes (Saravanakumar, 2007). Chez la plupart de ces organismes biopesticides, l'activité antagoniste a souvent été associée à la production de métabolites secondaires (Silva et *al.*, 2001).

Les biopesticides présentent l'avantage de ne pas être toxiques pour les vertébrés, d'être biodégradable et surtout d'avoir une spécificité et une efficacité d'action à faible dose sur les organismes nuisibles (Jaoua, 2005).

II.6.5. Stratégies de lutte contre les principales maladies du blé transmis par les semences

Ne pas utiliser de semences provenant d'un champ contaminé.

Utilise des variétés moins sensibles aux maladies.

Pour la fusariose des épis, après les précédents culturaux favorable comme le maïs, préférer un labour à des techniques culturales simplifiées.

Les traitements de semences peuvent être efficaces à condition d'utiliser un fongicide adapté à la localisation de la maladie au niveau de la semence. Notons toutefois que ces stratégies de lutte, élaborées dans le cadre de l'agriculture conventionnelle, ne sont pas forcément transportables en agriculture biologique compte tenu du cahier des charges.

Pour la fosariose (fonte de semis et fosariose du pied), les traitements de semences peuvent être efficaces pour combattre le champignon se conservant au niveau du grain. Si l'agent de la fosariose se trouve à la surface du grain, un fongicide de contact ou pénétrant peut être suffisant. S'il est à l'intérieur du grain, préférer un produit systémique.

Pour la carie, lorsque des spores se situent sur le semence, utiliser un fongicide de contact ou un pénétrant. Lorsque le sol est contaminé, préférer un systémique.

Pour le charbon nu, le champignon se conserve à l'intérieur des grains. L'usage d'un fongicide systémique est donc recommandé. (Anonyme 2013 p)

CHAPITRE III

Présentation du biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis*

III.1. Présentation du biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis*.

L'utilisation de microorganismes contre les insectes ennemis des cultures ou de la santé humaine, forme une lutte biologique dont la pratique est encore peu répandue. Cependant, elle repose sur une réalité digne d'intérêt puisque le caractère entomopathogène de certains microorganismes constitue une arme biologique particulièrement efficace.

Environ 1500 microorganismes entomopathogènes d'origines fongique, virale ou bactérienne sont actuellement connus. Selon Starnes et al, (1993) in (Kouassi, 2001) les bactéries entomopathogènes appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae, Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae. Parmi les Bacillaceae seul le genre *Bacillus* qui a fait l'objet d'une utilisation pour combattre les insectes : *Bacillus thuringiensis* qui a montré des potentialités insecticides les plus intéressants sur le plan des applications actuelles que sur celui des perspectives de développement des bioinsecticides bactériens.

III.2. Importance de *Bacillus thuringiensis*

D'après Charle et Coderre (1992), l'utilisation des biopesticides offre des avantages spectaculaires à court terme

- Il s'agit d'une technologie simple et bien adaptée à l'économie mondiale.
- C'est la méthode qui offre le plus de solutions véritables et durables principalement en raison de l'automatisme, de la variété, de la spécificité de la comptabilité intrinsèque avec la nature, et de leur capacité d'évoluer avec et sans intervention humaine directe.
- Une grande spécificité d'action et donc en principe, un moindre danger pour la santé humaine et intégrité du milieu.
- Ce sont des biopesticides relativement sécuritaire et sans danger pour les vertébrés, les plantes elles-mêmes, l'environnement et les ravageurs non visés.

- Les insecticides peuvent être facilement produits en grandes quantités par les méthodes de fermentations traditionnelles.

III.3. Les inconvénients :

D'après Charle et Coderre (1992), la spécificité des biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* confèrent à ceux-ci des avantages économiques par rapport aux insecticides traditionnels. Le marché potentiel étant moins vaste pour ces produits :

- Le spectre d'action est étroit pour une sous espèce bactérienne donnée.
- La toxine est inactivée par la lumière ultraviolette.
- Il existe une possibilité de résistance des insectes à l'insecticide microbien.
- Les toxines insecticides doivent être ingérées pour être efficace.
- L'incertitude d'obtenir des niveaux élevés de mortalité chez les ravageurs visés, liée à l'impossibilité de contrôler tous les facteurs qui conditionnent le succès de l'infection, le développement de la maladie le dépérissement de l'hôte.

D'après Anonyme (2008), sa faible rémanence oblige à répéter le traitement.

III.4. Présentation du *Bacillus thuringiensis*

III.4.1. Historique :

D'après Jean-Charles Cote et Kwang-Bo Joung (2000), *Bacillus thuringiensis* a été isolé pour la première fois en 1901 par le bactériologiste japonais S. Ishiwata à partir de vers à soie : *Bombyx mori* L. infectes.

En 1911, E. Berliner a rédigé la première description scientifique de la bactérie ; son nom: Bacille de Thuringe provient de cette description en Thuringe (Allemagne) (Doumandji-Mitiche et Doumandji, 1994).

En 1916, Aoki et Chigasaki ont montré que l'activité du *Bacillus thuringiensis* était due à une toxine présents dans les cultures sporulées, mais absente dans les jeunes cultures de cellules végétatives (Jean-Charles Cote et Kwang-Bo Joung ,2000).

En 1950, Lhost a déterminé l'intoxication des insectes émise par la toxine de cette bactérie (Doumandji-Mitiche et Doumandji, 1994).

En 1958, les premières formulations commerciales de *Bacillus thuringiensis* ont été mises à l'essai aux champs aux Etats-Unis.

En 1961, la sous-espèce *kurstaki* (Btk) a été utilisée comme biopesticide contre des lépidoptères nuisibles sensibles.

En 1976, la découverte de la sous-espèce *israelensis*, toxique pour les larves de moustiques et de simulies, et de la sous-espèce *tenebrionis*, toxique pour plusieurs espèces de Coléoptères (Jean-Charles Cote et Kwang-Bo Joung ,2000).

III.4.2 systématique de *Bacillus thuringiensis* :

Selon Larpent,(1990) *Bacillus thuringiensis* appartient à :

Règne : *Protistes*

Sous règne : *Procaryotes*

Domaine : *Eubacteria Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Bacillaceae*

Genre : *Bacillus*

Espèce : *Bacillus thuringiensis*

III.4.3. Caractères bactériologiques du genre: *Bacillus*

Larpent (1990); Perry et *al*, (2004) ont noté que:

- Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1 ,2 um jusqu'à 2,5 x 1 0 um),

- Sporules, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures),
- Généralement mobiles grâce à une ciliature pérित्रиче.
- Aérobie ou anaérobie facultatif.
- Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores (une seule spore par cellule végétative) souvent très résistantes dans le milieu extérieur,
- Les *Bacillus* sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol, l'eau douce ou de denrées alimentaires.

III.4.4. Descriptions de l'espèce

Bacillus thuringiensis est une bactérie Gram positive avec une endospore, qu'elle est sa forme de résistance (figure III.1 et figure III.2) (Perry et al., (2004)).

Sa protéine toxique (le cristal) peut constituer jusqu'à 30% de la masse totale de la cellule (figure III.1 et figure III.2) (Perry et al., (2004)).

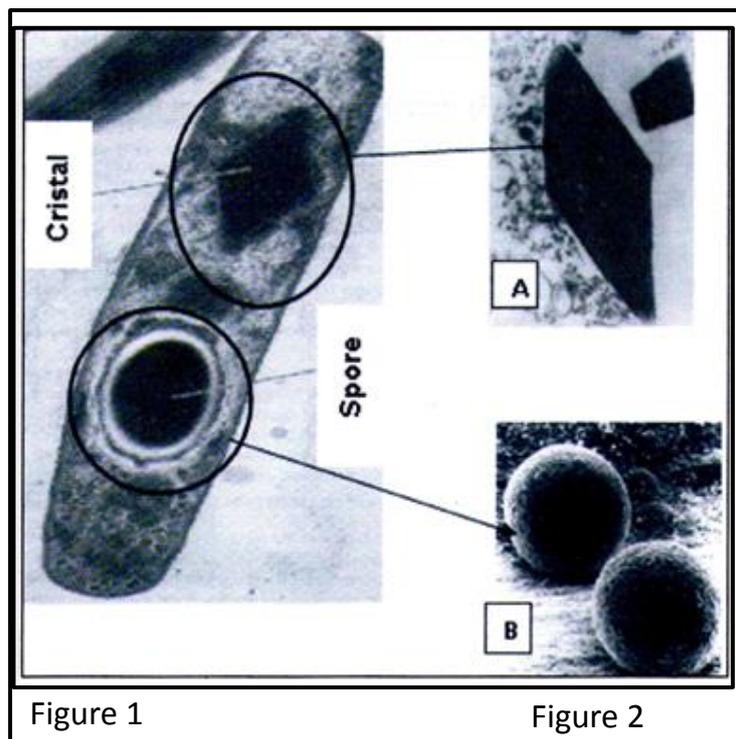


Figure III.1 : *Bacillus thuringiensis* en coupe longitudinale sous microscope électronique (Perry et al, 2004)

Figure III.2: A : Cristal de *Bacillus thuringiensis* (coupe ultrafine sous microscope électrique) (Perry et al, 2004) B : Spores de *Bacillus thuringiensis* sous microscope électronique (Perry et al, 2004)

La cellule végétative de *Bacillus thuringiensis* mesure 1 μm de largeur sur 5 μm de longueur, elle est pourvue de court flagelle cilié (Figure III.3), elle est caractérisée par sa capacité de produire une protéine cristalline durant la sporulation (Jean-Charles coté et Kwang-Bo Joung 200) (Figure III.4).

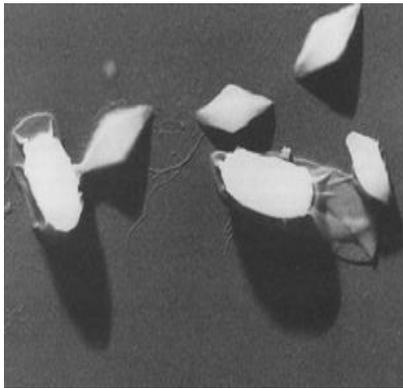


Figure III.3: Cristaux de Bt observés en microscopie électronique à transmission (Du et al, 1994).

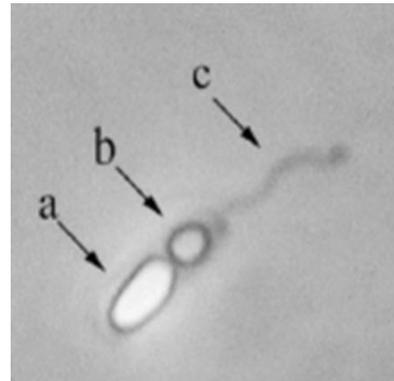


Figure III.4.: *Bacillus thuringiensis* en microscopie en contraste de phase ; a : spore ; b : inclusion parasporale contenant les cristaux de protéines ; c : filament (Rampersad et al., 2003).

III.4.5. Cycle biologique du *Bacillus thuringiensis* :

Selon Perry et al, (2004) les bactéries formants des endospores passent par deux phases de développement qui sont :

- Phase de sporulation
- Phase de croissance végétative (Germination) (figure III.5).

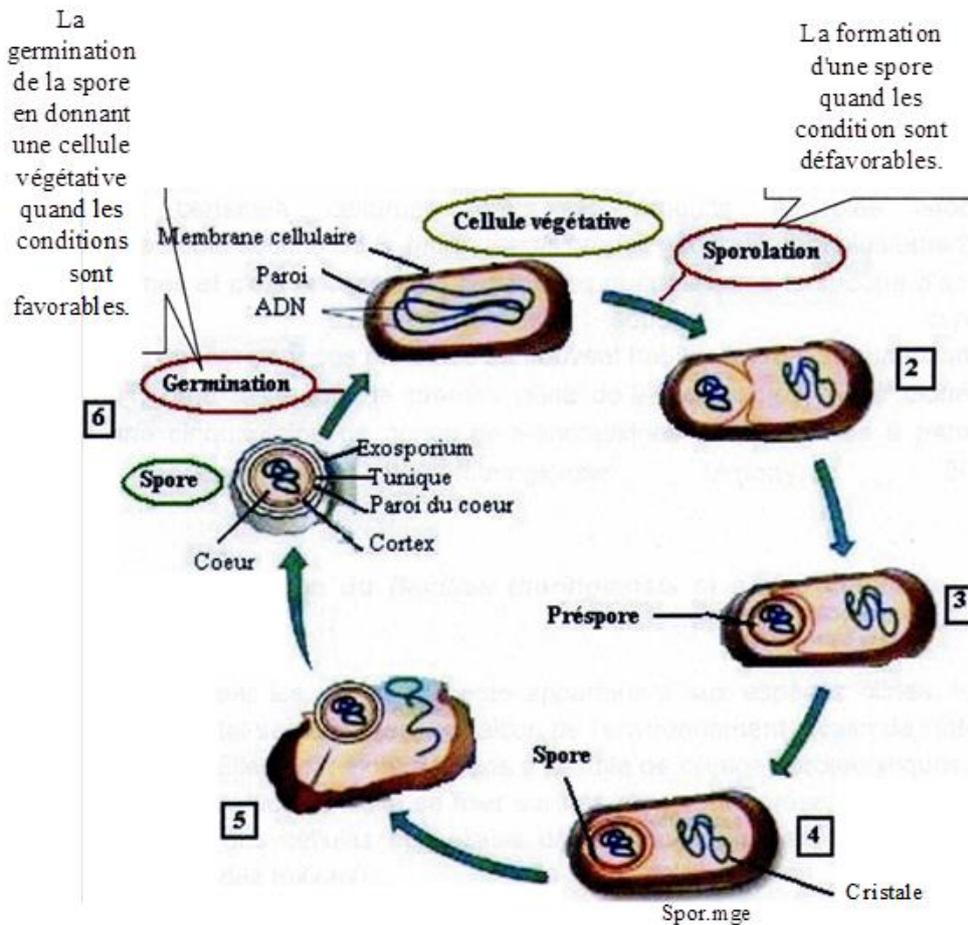


Figure III.4: Cycle biologique des bactéries formant des endospores

(Perry et al, 2004)

Légendes :

- 1 : Cellule végétative à deux molécules d'ADN
- 2 : Séparation de deux molécules d'ADN par une membrane cellulaire formée durant un processus de différenciation particulier.
- 3 : Stade d'inclusion : invagination de la membrane des deux cellules naissantes autour de la membrane de l'autre jusqu'à l'entourer complètement : formation de présore.
- 4 : murisseries de la présore en s'entourant par certains nombres d'enveloppes.
- 5 : la lésion de sporange en libérant la spore et le cristal.
- 6 : Réhydratation de spore, gonfle en détruisant la tunique et l'exosprum, libère le dipicolinate de calcium, et commence à ce multiplié comme la croissance végétative normale.

III.4.6. Les toxines de *Bacillus thuringiensis* (BT)

Des souches de la bactérie *Bacillus thuringiensis* synthétisent divers types de protéines cristallines insecticides ou δ -endotoxines-endotoxines, appelées Cry, types I-IV (et sous types). Ces produits sont d'importants bioinsecticides, non dangereux pour les mammifères, utilisés dans le monde entier contre les insectes nuisibles à certaines cultures, forêts et produits agricoles stockés. Notons qu'une seule souche de *B. thuringiensis* produit généralement plusieurs types de δ -endotoxines et c'est la variété de ces toxines qui détermine le spectre d'activité insecticide d'une souche donnée. Les gènes qui codent pour ces protéines se trouvent habituellement sur un plasmide. Depuis 1981, date à laquelle le premier gène de δ -endotoxines a été cloné, ont été isolés à partir de différentes souches de *B. thuringiensis* (Anonyme(a), 2007).

III.4.6.1. Mode d'action du *Bacillus thuringiensis* et cibles cellulaires des δ -endotoxines :

Une fois *B. thuringiensis* ingérée par les larves d'insecte appartenant aux espèces cibles, les δ -endotoxines du cristal sont libérées en raison de l'environnement alcalin de l'intestin moyen de la larve. Elles sont alors activées à la suite de clivages protéolytiques. Les toxines ainsi activées vont ensuite se fixer sur des récepteurs présents à la surface des microvillosités des cellules épithéliales de la paroi intestinale (fixation par la région C-terminale des toxines).

Après fixation sur le récepteur, la partie N-terminale des toxines va s'insérer dans la membrane cellulaire. L'oligomérisation des molécules de toxine va permettre la formation de spores qui vont interférer avec les systèmes de transport d'ions à travers la membrane cellulaire, et conduire à une modification du pH intestinal (Griffitts et Arorian, 2005).

Par la suite, les cellules affectées se gonflent et éclatent, causant la perforation de la paroi du tube digestif. Ceci provoque le passage du suc digestif dans la cavité corporelle de l'insecte et le mouvement inverse de l'hémolymphe. Bien que certains effets neurotoxiques aient été aussi observés, il semble qu'une perte complète d'intégrité causée par l'éclatement de son tube digestif serait la cause de la mort

chez un insecte empoisonné aux cristaux de *Bacillus thuringiensis* (Anonyme (b), 2007) (Figure III.6).

De plus, les spores des souches BTK peuvent germer dans le corps de l'insecte et produire des cellules végétatives qui peuvent déclencher une septicémie (Chevalier et al, 2002).

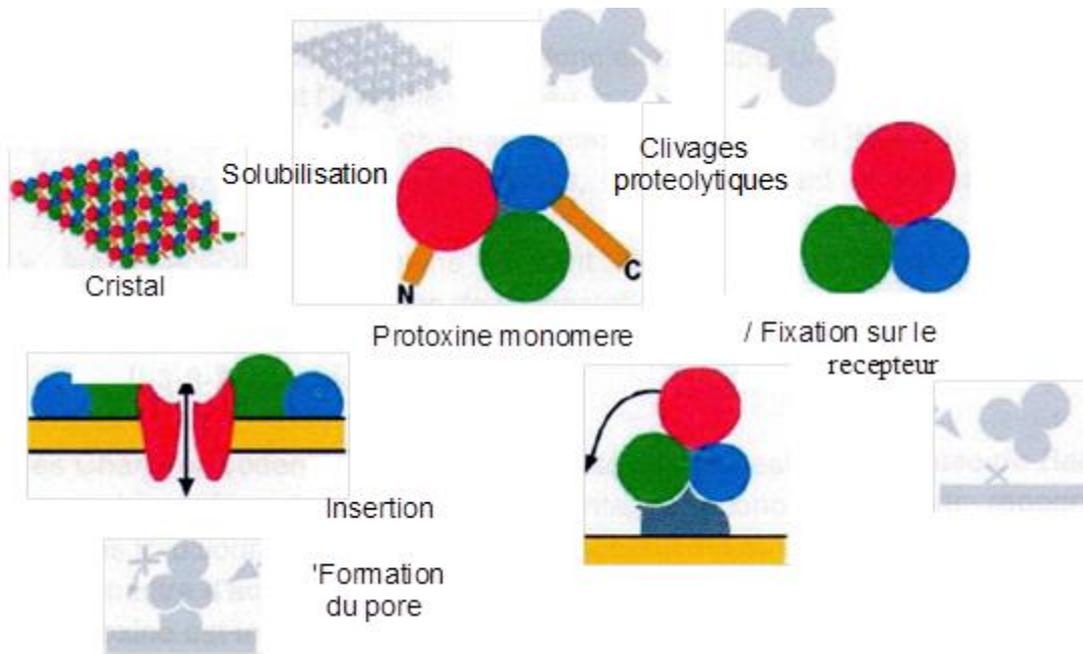


Figure III.6: Mode d'action des protéines Cry et mécanismes hypothétiques de résistance (Griffitts et Arorian, 2005).

III.4.7. Utilisation de *B. thuringiensis* et de ses dérivés en tant que biopesticide

L'intérêt pour les pesticides biologiques s'est développé dans le milieu des années 1970 du fait de l'augmentation de la résistance des insectes aux pesticides chimiques (pyréthrinoïdes) (Watkinson, 1994). Depuis plus de 20 ans, l'une des applications les plus réussies de *B. thuringiensis* est le contrôle des Lépidoptères dans les forêts du Canada et des Etats-Unis, par la souche HD-1 capable de produire les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2A, réduisant significativement l'utilisation d'insecticides chimiques (Bauce et al., 2004).

En effet, plusieurs millions d'hectares de forêt sont pulvérisés tous les ans par des produits issus de Btk (kurstaki) pour le traitement contre la spongieuse (*Lymantria dispar*) et la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*). Un avantage significatif des produits dérivés de *B. thuringiensis* est leur capacité à contrôler cette résistance chimique des insectes. Par exemple, en Australie, aux

Etats-Unis et en Extrême Orient, ils ont été utilisés pour le traitement contre les *Heliothis* sp et papillons nocturnes résistants aux pyréthrinoïdes. Ainsi, en diminuant la pression des insecticides chimiques, le risque de résistance est diminué et ces produits peuvent alors continuer à être utilisés (Watkinson, 1994). Cependant, des cas de résistance ont été observés chez certains insectes.

PARTIE II
EXPÉRIMENTALE

Chapitre IV

Matériels et méthodes

IV.1. Objectifs

Ce présent travail a pour objectifs d'évaluer l'efficacité fongicide de la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* sur la flore fongique isolé à partir des grains du blé tendre infesté par le charançon de riz (*Sitophilus oryzae*), cette étude comprend trois parties essentielles :

- La première partie consiste à l'élevage de charançon du riz (*Sitophilus oryzae*) sur trois échantillons du blé tendre.
- La deuxième partie consiste à l'isolement et l'identification des champignons accompagnatrice des grains du blé tendre infesté par charançon du riz (*Sitophilus oryzae*)
- La troisième partie concerne l'étude du pouvoir fongicide de *Bacillus thuringiensis* vis à vis le champignon de gains de blé tendre infesté par deux méthodes :

Méthode par activité volatile

Méthode par dilution dans un milieu gélosé (activité alimentaire)

IV.2. Matériels d'étude

IV.2.1. Matériel végétale

Avant toute analyse, il convient de prélever un échantillon représentatif du produit à analyser. Néanmoins, les techniques de prélèvements habituellement recommandées pour d'autres analyses ne sont guère probantes quand il s'agit d'analyses microbiologiques. En général, sur les produits secs, granuleux et pulvérulents, la microflore est toujours répartie de façon très hétérogène (Dunoyer, 1989). A ce titre, il faut noter que les résultats des examens microbiologiques n'ont de valeur que si certaines précautions d'échantillonnage ont été respectées :

- Prises d'échantillons avec des instruments stériles ;
- Mise de l'échantillon dans des récipients ou sachets stériles ;
- Respect des règles d'hygiène générale pour la personne effectuant le prélèvement ;
- Rapidité de l'acheminement des échantillons dans l'attente de leurs analyses ;
- Conservation des échantillons dans un endroit frais et sec (8 à 15°C) mais jamais à des températures négatives (Dunoyer, 1989).

Le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation c'est limité à trois variétés de blé tendre d'origine différentes appartenant à la famille des Poacées, genre de *Triticum* dont l'espèce est *Triticum aestivum L.* à partir de la production de la campagne 2012, délivré par L' ITGC: (Institut Technique des Grandes Cultures) d'El-Harrach, Alger (Tableau IV.1).

Tableau IV.1: Origine et date d'isolement des échantillons (ITGC, 2013).

échantillon	Station	Origine de prélèvement	variété	Date de prélèvement
D	Tiaret	ITGC (EL HARRACH)	AIN ABID	27/02/2013
E	Médéa (Bni slimen)	ITGC (EL HARRACH)	ARZ	27/02/2013
F	Guelma	ITGC (EH HERRACH)	ARZ	27/02/2013

IV .2.2. Matériel animal

A partir des trois échantillons de blé tendre un élevage de masse de *Sitophilus oryzae* a été conduit dans des boites en verre de capacité de 250g, contenu chaque une 1 échantillon de blé tendre, l'insecte est issu de l'ITGC (Figure IV.1).



Figure IV.1: Echantillons des grains de blé tendre dans l'étuve (Original, 2013)

IV.2.3. Matériel microbiologique

Notre avons utilisé Pour l'évaluation fongicide une bactérie endophyte *Bacillus thuringiensis* fourni gracieusement par le centre de recherche scientifiques et techniques des zones arides CRSTRA de Biskra.

IV.3. Isolement et recherche de la microflore du stockage

5 à 6 graines ont été utilisées pour la détection éventuelle des agents fongiques des maladies du stockage.

IV.3.1. Désinfection et isolement

Chaque graine a subi au préalable une désinfection pour éliminer le maximum de la microflore secondaire ou accessoire de la surface. Les graines ont été désinfectées par leur passage dans un bain d'eau javellisée (2°) pendant 20 à 30 minutes, suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile.

Après désinfection, les graines ont été déposés dans des boites de Pétri contenant un milieu gélose,

Les isolements ont été effectués sur le milieu de cultures PDA (Potato Dextrose Agar) (annexe 1) (Figure IV.2).

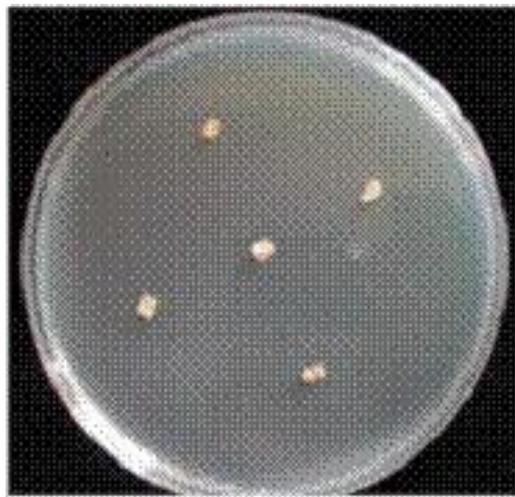


Figure IV.2 : Mise en culture des graines dures milieu PDA (Original 2013).

IV.3.2. Observation et purification des cultures

Après 5 à 6 jours d'incubation à 25C° et à l'obscurité, seulement les colonies présentant des caractéristiques macromorphologiques ressemblant à ceux de l'agent causal recherché qui ont été délimités et transplantés dans de nouvelles boites de pétri sur le milieu PDA. Les caractéristiques culturelles recherchées sont surtout le type de croissance des colonies, la couleur et la texture du mycélium.

Après incubation dans les mêmes conditions précitées, chaque colonie a été observée en vérifiant sa pureté culturelle, après plusieurs repiquages, jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Pour s'assurer de la pureté de nos isolats des observations microscopiques ont été effectuées sous un grossissement (40x10x10).

Les principaux caractères microscopiques pris en considération; ce sont les champignons qui sont accusés d'être présent dans les lieux de stockage, la nature des hyphes, les caractéristiques des asques et des ascospores, le type du mycélium et la présence des fructifications.

IV.4. Préparation des dilutions a testés

IV.4.1. Préparations des suspensions

A partir de *Bacillus thuringiensis* poudre, nous préparons les doses à tester après dilution dans l'eau distillée stérile ce dernier est utilisé comme témoin. A partir de cette suspension mère, nous avons choisi une gamme de concentrations pour l'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* vis-à-vis des champignons isolés et identifiés. Les concentrations utilisées sont:

- Témoin : 1l d'eau distillée stérile.

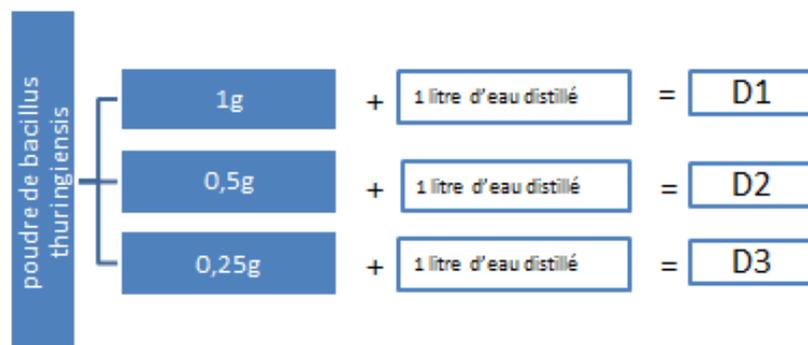


Figure IV.3 : schéma de préparation des doses de traitement pour le test d'antagonisme (original 2013)

IV.4.2. Dilution dans un milieu gélosé

Cette méthode consiste à mélanger *Bacillus thuringiensis* en poudre avec le milieu de culture stérilisé, deux doses différentes du *B. thuringiensis* mélangés avec le milieu ; 1g et 0,5g par litre de milieu de culture stérilisé. Chaque test est répété trois fois.

IV.5. Application des traitements biologiques

Pour l'évaluation de l'activité antifongique de la bactérie *Bacillus thuringiensis* utilisée, nous avons réalisé des tests biologiques *in vitro* à travers par deux modes de traitement par volatilité et par et activité alimentaire.

IV.5.1. Etude du pouvoir antifongique *in vitro* du *Bacillus thuringiensis* :

Cinq champignons sélectionnés à partir des isolats obtenus ont été traité par le biopesticide d'origine microbienne à travers deux méthodes qui consistent à déposer au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu de culture, un disque mycélien issu d'une culture fongique jeune découpé à l'aide d'un emporte pièces de 8 mm de diamètre.

Pour l'activité volatile, des disques de papier Wattman de 8 mm de diamètre, préalablement stérilisés à l'autoclave (120°C. pendant 30 min), sont d'abord imprégnés et saturés avec trois doses différentes de la suspension de *Bacillus thuringiensis* dilués puis déposés sur le couvercle de la boîte de Pétri retourné, à raison de 1 disque imprégné par couvercle (Inouye et *al.*, 2006 ; Chutia et *al.*, 2009). Le témoin consiste en des disques imprégnés avec le même volume d'eau distillée stérile. Chaque test est répété trois fois.

IV.6. Lecture des résultats

La lecture des résultats de l'activité antifongique du *Bacillus thuringiensis* vis-à-vis des champignons est effectuée après sept jours et 15 jours d'incubation. Les isolats fongiques traités présentant une faible croissance par rapport au témoin sont des isolats sensibles aux bactéries. L'évaluation de l'activité antifongique du *Bacillus thuringiensis* se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance mycélienne. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant à l'œil nu les diamètres de la croissance du pathogène en millimètre à l'aide d'une règle en métal graduée.

La croissance radiale est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en utilisant la formule décrite par Pandey et *al.*, (1982) :

$$PI(\%) = (DT-DPA/DT) \times 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés (%).

DT : croissance diamétrale du témoin (mm)

DPA : croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste (mm).

IV.7. Analyse statistique des résultats

Tous les essais ont été répétés au moins trois fois et trois doses différentes pour chaque champignon, par la suite un calcul des moyennes a été réalisé.

Les résultats recueillis sur les tests du pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* ont fait l'objet d'analyses statistiques.

Afin de vérifier une éventuelle efficacité du *B. thuringiensis* vis-à-vis des isolats fongiques testés, des analyses ont été faites en utilisant la procédure décrite par le SYSTAT vers. 12, SPSS 2009.

Dans les conditions paramétriques (ANOVA pour ANalysis Of VAriance), la distribution de la variable quantitative doit être normale. Afin de tester les interactions entre les facteurs (dose, compartiment), nous avons alors utilisé le modèle linéaire global (G.L.M.).

Afin de vérifier une éventuelle efficacité du *B. thuringiensis* vis-à-vis de souches fongiques testées, nous avons utilisé la procédure décrite dans PAST vers 1.81 [290]. Les analyses de covariance ont été conduites en considérant les diamètres des zones d'inhibition comme moyennes et les souches à testées comme les variances.

Les corrélations existantes entre *B. thuringiensis* et sa dilution et les souches fongiques sont mises en évidence par une analyse en composantes principales (ACP). Dans ce type de test, BT et sa dilution ont des coordonnées comprises entre - 1 et + 1 et appartiennent à un cercle de corrélation. L'interprétation de l'ACP se fait

à partir de l'examen du cercle des corrélations et de la position du statut des variables sur les axes factoriels (Philippeau, 1986).

L'hypothèse de l'efficacité antifongique du *B. thuringiensis* est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé, par utilisation du logiciel PAST – Palaeontological STatistics, ver. 1.81.

Chapitre V

Résultat et discussion

V.1. Recherche des fongique du stockage

Les isollements ont été réalisés avec les graines de trois variété de blé tendre infestées par un ravageur primaire de stockage Le charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L.) après 1 mois de stockage. Nos isollements ont relevé la présence d'une flore fongique très importante. Dominé par le genre *Aspergillus* et suivi par le genre *Fusarium*. Les différents isollements réalisés ont permis de purifier quelques isolats présentant des caractères cultureux ressemblant à ceux citées en dessus.

V.1.1. Caractères microscopique et macroscopique des champignons isolés

Sur le milieu PDA, le genre *Aspergillus* est représenté essentiellement par trois espèces, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* et *Aspergillus niger* (Figure VI.1).

A. *Aspergillus* sp

➤ Caractères macroscopiques

- Les colonies de couleur : verdâtre, marron à verdâtres, forte odeur
- Aspect : le mycélium ras,
- Forme : régulière
- La couleur se transforme avec le temps

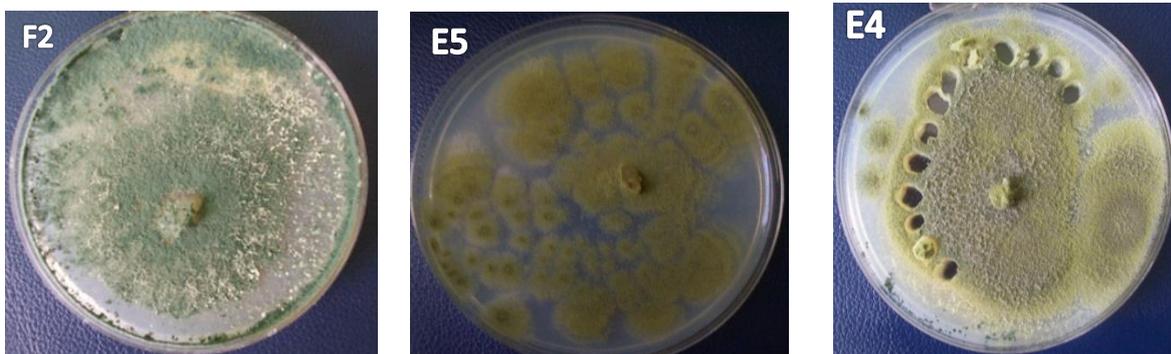


Figure V.1 : Forme macroscopique d'*Aspergillus flavus* (F2) ; *Aspergillus niger* (E5) et d'*Aspergillus clavatus* (E4) (original, 2013)

➤ Caractères microscopiques

Entre lame et lamelle, et sans utilisation de colorant l'observation microscopique montre que :

- Le mycélium : jeune est hyalin, cloisonné et ramifié, porte des bourgeons qui se développent rapidement pour donner un nouveau mycélium (Figure V.1).

B. *Fusarium sp*

➤ **Caractères macroscopiques**

- Les colonies de couleur : Blanche au centre et violet au revers
- Aspect : ras, aérien et subaérien, cotonneux,
- Forme : régulière

➤ **Caractères microscopiques**

Entre lame et lamelle, et sans utilisation de colorant l'observation microscopique montre que :

- Le mycélium : jeune est hyalin, cloisonné (Figure Figure V.2).
- Conidiophore : court et plus au moins court
- Conidies : hyaline avec une forme ovoïde



Figure V.2: Forme macrosopique de *Fusarium sp* (origina, 2013)

Nous avons utilisé pour la détermination des isolats fongiques obtenus la clé saccardo

V.2. Evolution temporelle de pouvoir antifongique du produit biologique à base de *Bacillus thuringiensis* sur des isolats fongiques

L'activité antifongique d'un biopesticides d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été évaluée *in vitro* sur trois isolats fongiques (F2,E5 , E4) à travers deux mode d'actions : par l'activité volatile et par dilution dans le milieu gélosé. Nous avons constaté que les différentes doses et les deux modes d'action sont révélées actifs sur les champignons testés. La réaction s'est manifestée d'une

manière observable par inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes fongiques, dès les premiers jours d'incubation.

V.2.1. Étude de l'efficacité fongicide de biopesticide à base de *B. thuringiensis* sur les isolats fongiques par activité volatile

L'étude du pouvoir antifongique de produit biologique à base *B. thuringiensis* sur les isolats fongiques isolé, à partir de blé tendre infesté par *Sitophilus oryzae*, on utilisant la méthode d'activité volatile a montré dans le tableau VI. 1 que *Bacillus thuringiensis*, s'est révélé efficace sur tous les isolats fongiques étudiés se traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes qui varie d'une espèce à une autre avec le taux d'inhibition qui varie entre(12% et 56%) (Figure V.3).

Tableau V. 1 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de produit biologique à base de *Bacillus thuringiensis* avec les trois souches fongiques par l'activité volatile.

		7J				15J			
		D1	D2	D3	Témoin	D1	D2	D3	Témoin
F2	D(mm)	36,67	49,33	48,33	65,00	42,67	51,67	49,67	67,00
	PI%	43,59	24,10	25,64	0	36,32	22,89	25,87	0
E5	D(mm)	17,67	28,00	35,00	40,00	20,67	27,67	38,00	44,00
	PI%	55,83	30,00	12,50	0	53,03	37,12	13,64	0
E4	D(mm)	31,67	33,00	34,67	50,00	54,33	44,00	44,67	62,00
	PI%	36,67	34,00	30,67	0	12,37	29,03	27,96	0

(F2) *Aspergillus flavus*; (E5) *Aspergillus niger* et (E4) *Aspergillus clavatus*



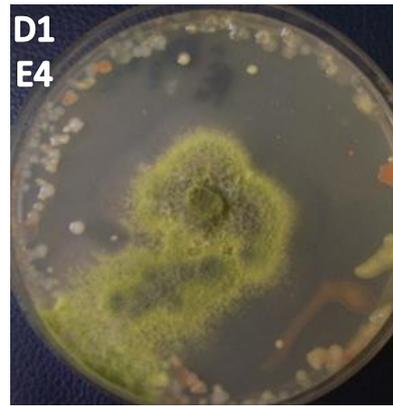
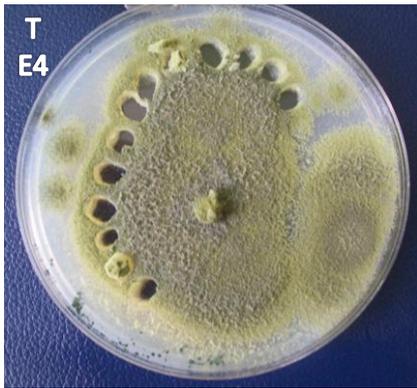
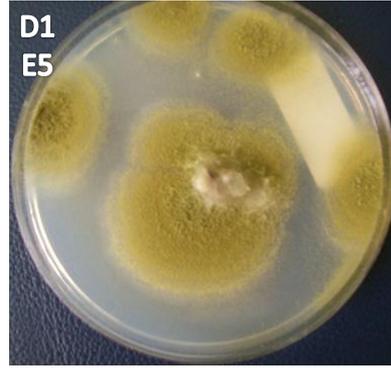
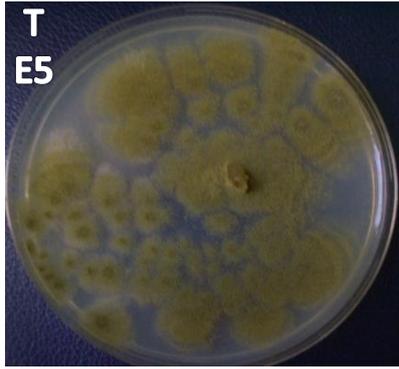


Figure V.3 : Pouvoir antifongique de *B. thuringiensis* par activité volatile représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement (originale, 2013).

(F2) *Aspergillus flavus*; (E5) *Aspergillus niger* et (E4) *Aspergillus clavatus*

V.2.1.1. Tendence globale d'effet du produit biologique (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique F2

Le champignon F2 traité avec le *B. thuringiensis* à différentes dilutions montre une inhibition qui augmente dans le temps et qui se traduit par le pourcentage d'inhibition de sa croissance mycélienne (PI). Cependant, après 7 jours de culture, nous constatons une augmentation du taux d'inhibition pour les trois dilutions appliquées avec une évolution respective de 43,59% pour la dilution (D1), 24,10% pour la dilution(D2) et 25,64% pour la dilution (D3). Après 15 jours de traitement, la dilution (D1) présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé soit (PI=37%). (Figure V. 4).

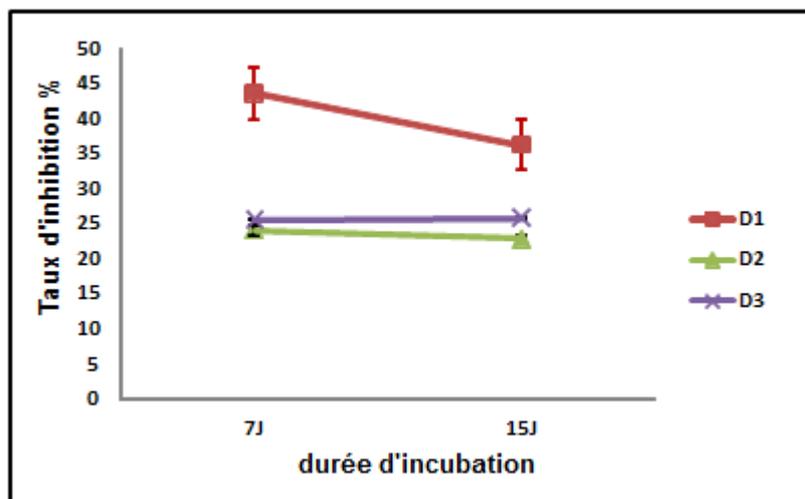


Figure V. 4 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide d'origine microbienne à base de *B. thuringiensis* sur l'isolat fongique F2

D1 :1g/l ; D2/ 0,5g/l ; D3 : 0,25g/l

V.2.1.2. Tendence globale d'effet du produit biologique (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique E4

Le biopesticide d'origine microbienne appliquée sur E4 montre qu'après 7 jours de traitement, une évolution temporelle du taux d'inhibition de la croissance mycélienne a été notée. Cette progression est de 55.83% pour la dilution(D1), de 30% pour la dilution (D2) et de 12,50% pour la dilution (D3). La dilution (D1) révèle le taux d'inhibition le plus marqué par rapport à celui des deux autres dilutions (Figure V. 5).

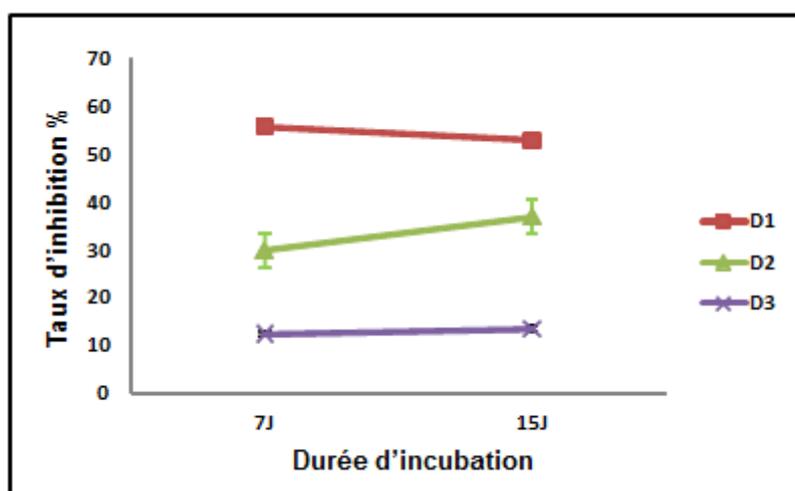


Figure V. 5 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du biologique d'origine microbienne à base de *B. thuringiensis* sur le champignon E.

V.2.1.3. Tendence globale d'effet du produit biologique (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique E5

Le traitement de l'isolat E5 par la dilution (D1) du biopesticide à base de *B. thuringiensis* indique une évolution temporelle progressive qui enregistre de 7 à 15 jours un taux d'inhibition de la croissance mycélienne évoluant de 22,88%. Les dilutions (D1) et (D3) montrent également une évolution dans le temps mais qui se traduit par des taux d'inhibition relativement faibles. (Figure V. 6).

Cependant on note que produit appliquée avec la dose D2 montre le taux d'inhibition le plus élevé par rapport au deux autres doses.

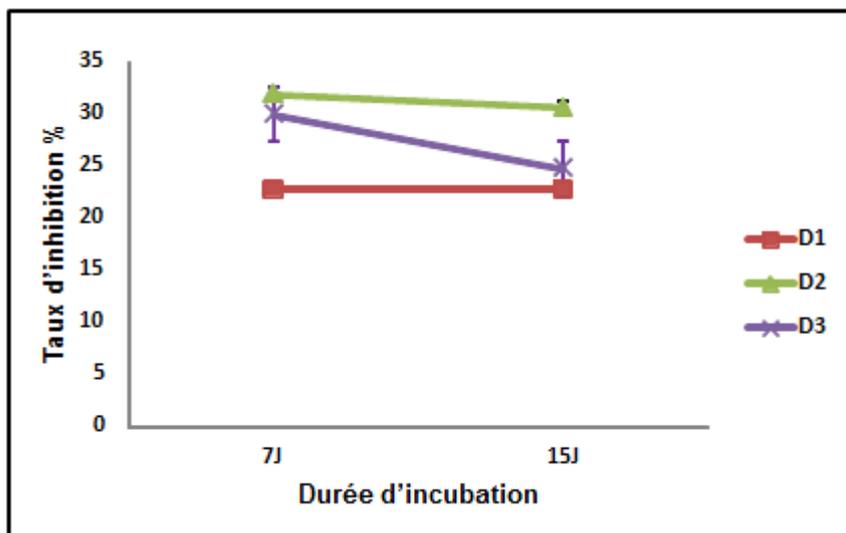


Figure V. 6 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide d'origine microbienne à base de *B. thuringiensis* sur le champignon E5.

L'analyse en composantes principales, effectuée avec le logiciel PAST est satisfaisante pour l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 90% de la variance sont exprimés sur les 2 premiers axes.

Ce test traduit l'effet de traitement biologique avec *Bacillus thuringiensis* et exprime sur les deux axes de l'ACP, que les doses ont un effet comparable et différent sur les champignons.

La C.H.A. (classification hiérarchique ascendant) prise à une similarité de (- 12), montre l'existence de trois groupes : le premier groupe comprend (E5), le deuxième groupe comprend (F2) et le troisième groupe comprend (E4) (voir annexe 2).

L'analyse multivariée sur l'axe 1 (86,75%) indique que l'effet temporel de D1 se distingue clairement de la dose D2 et la D3.

La projection des vecteurs à travers le deuxième axe montre que les deux doses D1 et D3 se corrént négativement par rapport au D2 et la dose D1 se corrént positivement par rapport D3 (figure V.7).

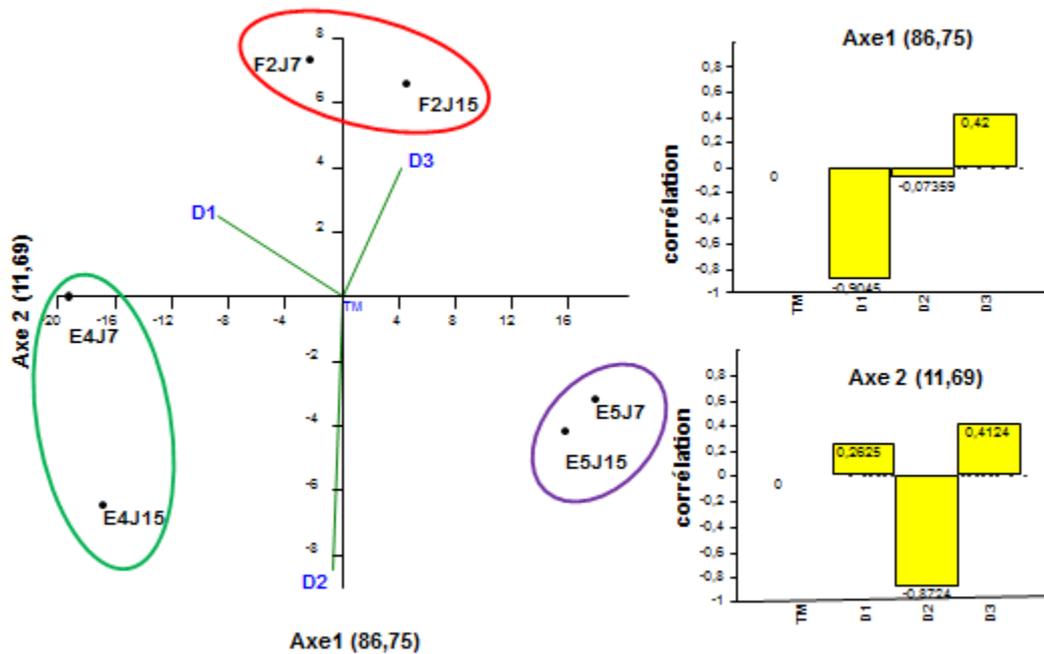


Figure V.7: Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des 3 isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation.

TM : Témoin D1 :1g/l ; D2/ 0,5g/l ; D3 : 0,25g/l

Effets comparés de l'efficacité du *Bacillus thuringiensis* sur cinq isolats fongiques :

Le modèle général linéaire (G.L.M) a été utilisé afin de déterminer l'effet strict des traitements biologiques à base de *Bacillus thuringiensis* sur la croissance mycélienne de trois souches fongiques en fonction de différentes doses. Ce model nous a permet d'étudier l'effet individuel de chaque facteur sans l'intervention des interactions entre eux (figure V.7).

À partir des résultats obtenus par ce modèle, nous remarquons que les effets antifongiques de *Bacillus thuringiensis* sont hautement significatifs selon la

concentration du produit (F-ratio=8.750, P=0.000; P<0.01), Quand les effets des isolats fongiques testés et la durée de l'inhibition est non significatif avec leurs valeurs respectives (F-ratio=0.679, P=0.512; P>0.05) (F-ratio=0.050, P=0.823 ; P>0.05).

Tableau V. 2: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés pour le mode d'action l'activité volatile

facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	P
Durée	14.017	1	14.017	0.050	0.823
Dose	7321.461	3	2440.487	8.750	0.000
Pathogène	378.633	2	189.317	0.679	0.512

P>0,05 probabilité non significative, P<0,05 probabilité significative, P<0,01 probabilité hautement significative

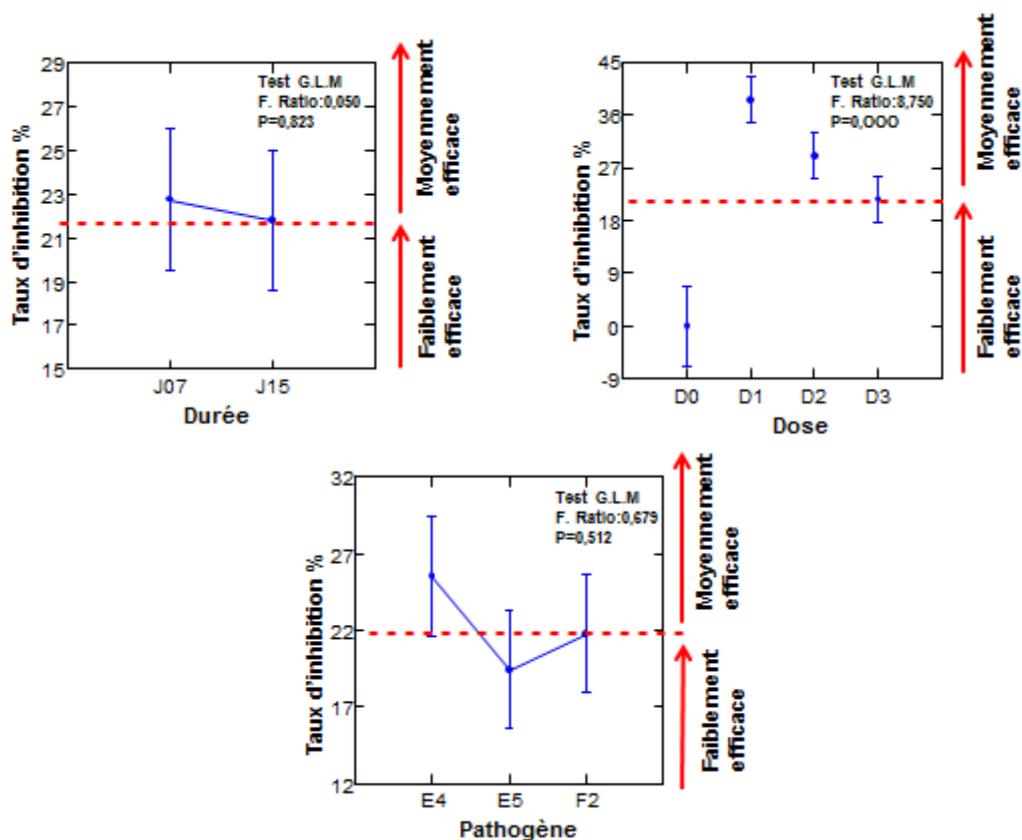


Figure V.8: Effet de *Bacillus thuringiensis* par l'activité volatile (durée, dose) sur les isolats fongiques.

D0 : Eau distillé ; D1 : 1g/l ; D2/ 0,5g/l ; D3 : 0,25g/l

Cette figure montre l'effet des différentes doses appliquées sur les isolats fongiques en fonction du temps.

Nous constatons que la dose D1 montre le degré d'efficacité moyenne suivi par la D2, enfin on trouve la D3 qui présente une efficacité faible (Figure VI.8).

Concernant l'effet temporel les doses montrent une toxicité qui diminue à 15 jours.

L'interaction des facteurs ; dose et durée, durée et pathogène, dose et pathogène nous présente une régression temporelle du taux d'efficacité des différentes doses. Cette tendance est vérifiée par le test de l'analyse de la variance type ANOVA où les différences sont non significative (F-ratio=0.485; p=0.695; p>0,05 ; F-ratio=0.336; p=0.717; p>0,05 et F-ratio=2.161; p=0.070; p>0,05).

V.2.2. Étude de l'efficacité fongicide de biopesticide à base de *B. thuringiensis* sur les isolats fongiques par dilution dans le milieu gélosé :

Les résultats du tableau (V.3) pouvoir antifongique de produit biologique à base *Bacillus thuringiensis* sur les isolats fongiques en utilisant la méthode (dilué au milieu gélosé). Cette technique s'est révélé efficace sur tous les isolats fongiques étudiés se traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes qui varie d'une espèce fongique à une autre (Figure V.9).

Tableau V. 3 : Résultats des tests du pouvoir antifongique par dilution dans le milieu gélosé.

		7J			15J		
		D1	D2	Témoin	D1	D2	Témoin
F2	D(mm)	69,00	71,33	80	77,67	83,33	85
	PI%	13,75	10,83	0,00	8,63	1,96	0,00
E5	D(mm)	38,33	46,67	80	85,00	75,00	85
	PI%	52,08	41,67	0,00	0,00	11,76	0,00
E4	D(mm)	37,67	50,00	55	61,67	78,00	85
	PI%	31,52	9,09	0,00	27,45	8,24	0,00

(F2) *Aspergillus flavus*; (E5) *Aspergillus niger* et (E4) *Aspergillus clavatus*

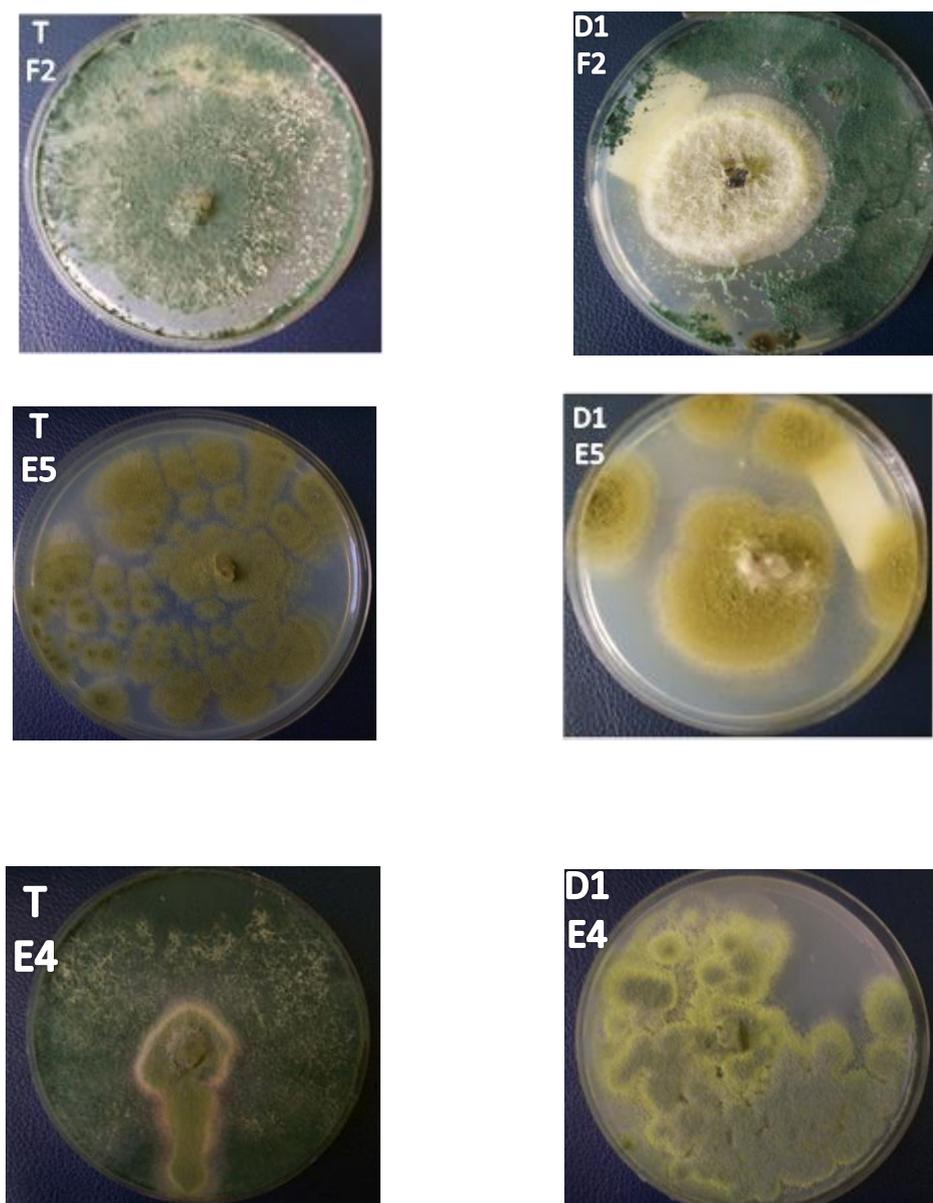


Figure V.9 : Pouvoir antifongique de *B. thuringiensis* par dilution dans le milieu gélosé représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement (originale, 2013).

(F2) *Aspergillus flavus*; (E5) *Aspergillus niger* et (E4) *Aspergillus clavatus*

V.2.2.1. Tendance globale d'effet du produit biologique (*B. thuringiensis*) sur le champignon F2

Le biopesticide d'origine microbienne appliquée sur F2 montre qu'après 7 jours de traitement, une évolution temporelle du taux d'inhibition de la croissance mycélienne a été notée. Cette progression est de 13.75% pour la dilution (D1) et de

10.83% pour la dilution (D2). La dilution (D1) révèle le taux d'inhibition le plus marqué par rapport à celui de la dose (D1) (Figure V.10).

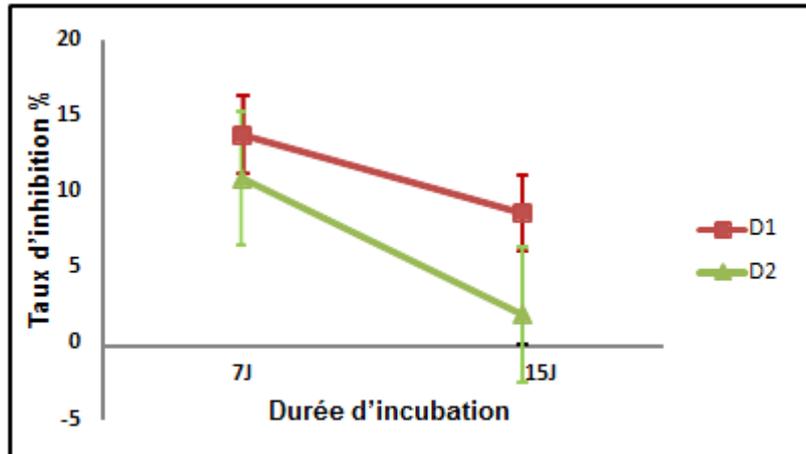


Figure V.10 : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du produit biologique d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* sur le champignon F2.

D1 :1g/l ; D2/ 0,5g/l

V.2.2.2.Tendance globale d'effet du produit biologique (*B. thuringiensis*) sur le champignon E5

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon E5 trouvé après l'application de produit biologique à base de *Bacillus thuringiensis* montre un effet faiblement efficace des trois doses utilisées s'étalant sur une durée après traitement de deux semaines. Cependant on note que produit appliquée avec la dose D1 après sept jours montre le taux d'inhibition le plus élevée (52,08%) par rapport au deux autres doses (figure V.11).

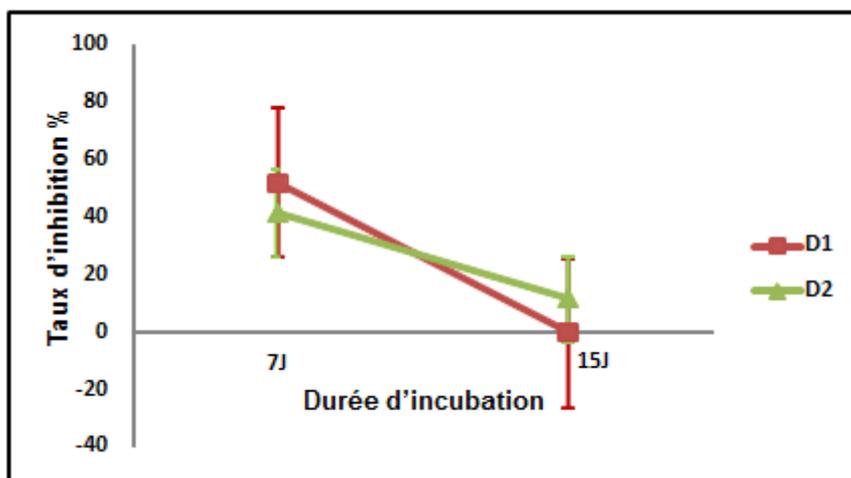


Figure V.11: Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du produit biologique d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* sur le champignon E5.

V.2.2.3. Tendence globale d'effet du produit biologique (*B. thuringiensis*) sur le champignon E4

Le champignon E4 traité par le biopesticide à base de *B. thuringiensis* montre de 7 à 15 jours une augmentation du taux de croissance mycélienne pour toutes les doses appliquées avec une évolution allant de 31,52% pour la dose complète (D1), suivie de 9,09% pour la dose (D2). Cependant, la dose (D1) offre le taux d'inhibition de la croissance mycélienne le plus élevé (figure V.12).

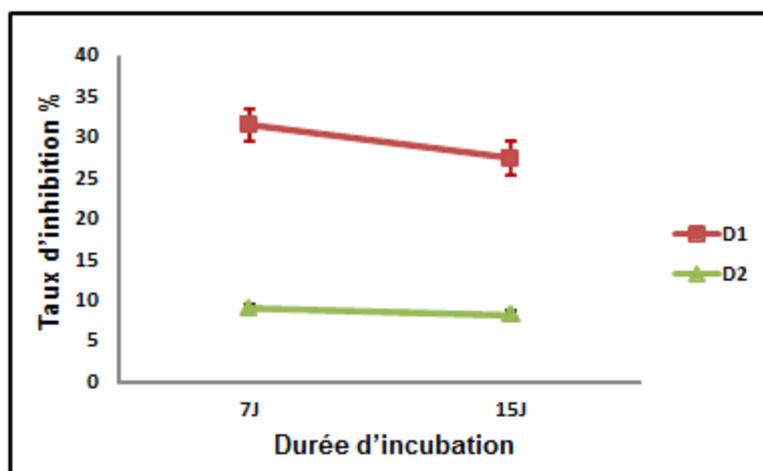


Figure V.12. : Evaluation temporelle du pouvoir antifongique du produit biologique d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* sur le champignon E4.

L'analyse en composantes principales est satisfaisante pour l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 90% de la variance sont exprimés sur les 2 premiers axes.

Ce test traduit l'effet de traitement biologique avec *Bacillus thuringiensis* et exprime sur les deux axes de l'ACP, que les doses ont un effet comparable et différent sur les champignons.

La C.H.A. (classification hiérarchique ascendant) prise à une similarité de (- 20), montre l'existence de trois groupes : le premier groupe comprend (F2 et E5J15), le deuxième groupe comprend (E4) et le troisième groupe comprend (E5J7) (voir annexe 3).

L'analyse multivariée sur l'axe 1 (88,83%) indique que l'effet temporel de dose D1, se distingue clairement de la dose D2.

L'effet de dose joue un rôle important. Pour la dose D1 enregistre un effet comparable, la même chose pour D2.

La projection sur le premier axe (88,83%) montre que la dose D1 se corrèle positivement par rapport au D2 (Figure V.11).

La projection des vecteurs à travers le deuxième axe montre que la dose D1 se corrèle négativement par rapport au D2 (Figure V.11).

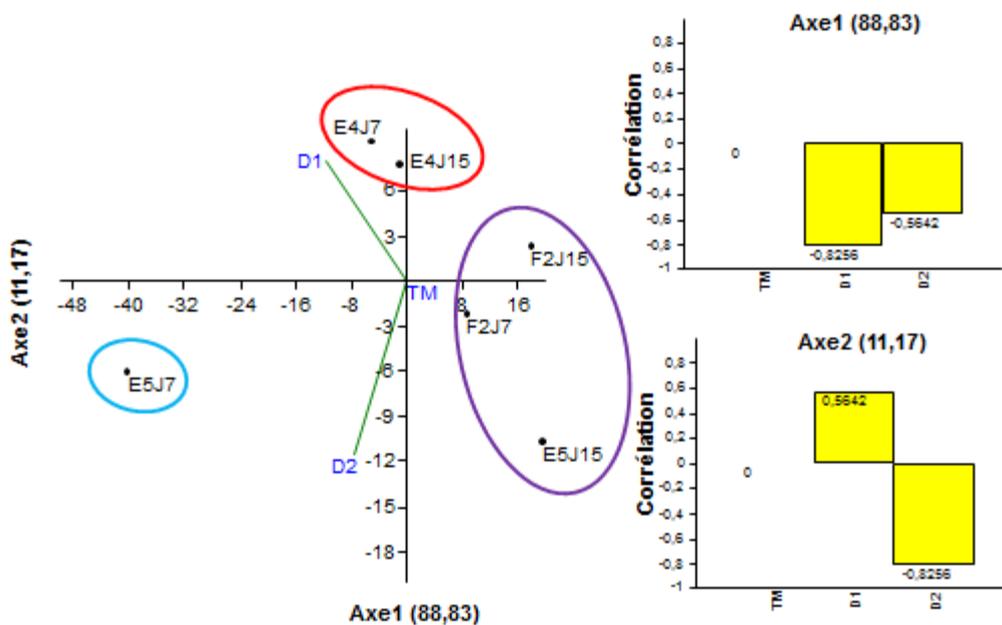


Figure V.13: Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des 3 isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation.

TM : Témoin ; D1 :1g/l ; D2/ 0,5g/l ; D3 : 0,25g/l

Effets comparés de l'efficacité du produit biologique à base de *Bacillus thuringiensis* et ses doses sur les trois isolats fongiques :

À partir des résultats obtenus par le modèle général linéaire (G.L.M), nous remarquons que les effets antifongiques de *Bacillus thuringiensis* sont hautement significatifs selon la concentration du produit et la durée d'inhibition, (F-ratio=6,683 P=0.003; P<0,01) (F-ratio=13,082 ; P=0.001; P<0,01) Quant à les souches fongiques testées est significative selon les champignons avec la valeur (F-ratio =4.883, P=0.013 ; P>0,05).

Tableau V. 4: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés pour le mode d'action dilution dans le milieu gélosé

facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	P
Durée	2185,929	1	2185,929	13,082	0.001
Dose	2233,460	2	1116,730	6,683	0.003
Pathogène	1631,762	2	815,881	4.883	0.013
P>0,05 probabilité non significative, P<0,05 probabilité significative, P<0,01 probabilité hautement significative					

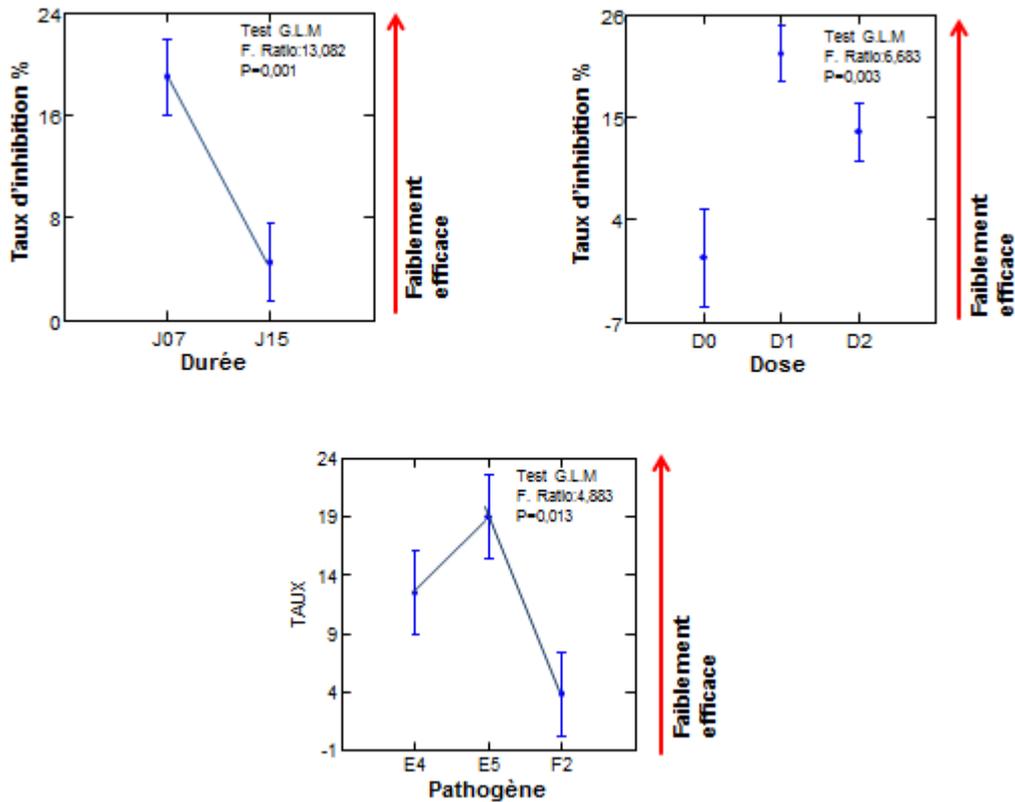


Figure V.14: Effet de *Bacillus thuringiensis* par dilution dans le milieu gélosé (durée, dose) sur les isolats fongiques

D0 : Eau distillé ; D1 : 1g/l ; D2/ 0,5g/l ; D3 : 0,25g/l

Cette figure montre l'effet des différentes doses appliquées sur les isolats fongiques en fonction du temps.

Nous constatons que la dose D1 montre le degré d'efficacité moyenne suivi par la D2 qui présente une efficacité faible (Figure V.14).

Concernant l'effet temporel les doses montrent une toxicité est diminué a 15 jours par rapport au 7jours.

L'interaction des facteurs ; dose et durée, durée et pathogène, dose et pathogène nous présente une régression temporelle du taux d'efficacité des différentes doses. Cette tendance est vérifiée par le test de l'analyse de la variance type ANOVA où les différences sont non significative (F-ratio=3.478 ; p=0.147; p>0.05 et F-ratio=4.681; p=0.403; p>0.05 et F-ratio=0.766; p=0.616; p>0.05).

Discussion générale

Les ravageurs et les organismes phytopathogènes des stocks sont responsables de nombreux dégâts et maladies affectant les céréales, ces denrées constituent la base de l'alimentation humaine. L'utilisation des pesticides chimiques efficace contre les organismes a entraîné de multiples conséquences sur l'environnement. Il devient par conséquent, indispensable de contrôler biologiquement ces organismes.

Les graines de céréale forment un excellent substrat pour les moisissures (Mills, 1990), la présence des ravageurs (d'autre entité vivante) renforce les conditions favorables pour le développement de ces dernières.

Plusieurs études ont montré que les produits naturels issus des microorganismes représentent une importante source de molécules pouvant être exploitées dans différents domaines entre autres la protection phytosanitaire.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'un biopesticide d'origine microbienne afin de mettre au point des méthodes de lutte intégrée, efficaces et facilement utilisables par les gestionnaires de la filière stockage des semences céréalières.

Deux objectifs ont été menés tout au long de cette étude. Le premier concernait l'étude de l'isolement de la flore fongique qui accompagne les graines de blé infesté par le charançon du riz. Et le second, est de tenter de trouver un éventuel pouvoir fongicide *in vitro* d'un biopesticide d'origine microbienne à base de *B.thuriengisis* vis-à-vis des d'isolats de champignons phytopathogènes.

Les résultats qui vont être discutés suite aux résultats révélés par cette étude, concernent l'évaluation de l'activité antifongique sur les champignons isolés; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus niger* et *Aspergillus clavatus* d'un biopesticide. L'intérêt de cette étude réside dans le fait que ces champignons menacent les céréales considérées comme des cultures stratégiques.

Nos résultats montrant que le taux de contamination du blé tendre infesté par *Sitophilus oryzae* et par le genre *Aspergillus* est le plus élevé suivi par le genre *Fusarium*. Comparativement avec les études de Belyagoubi 2010.

En effet l'origine de la contamination des graines de céréales par ce type de moisissure est difficile d'être cerné (champ, transport lieu de stockage). Les conditions défavorables de stockage favorisent l'installation et le développement des moisissures constituant des facteurs de détérioration des céréales affectant la qualité technologiques des graines et la qualité sanitaire par la sécrétion des mycotoxines.

Le parcours vers l'utilisation des biopesticides d'origine microbiennes comme alternative des agents chimiques reste une solution prometteuse.

Les résultats obtenus dans cette étude semblent être intéressants et confirment le pouvoir antifongique de *B.thuriengisis* vis-à-vis les bioagresseurs ciblés.

1. Activité fongicide du bioproduit d'origine microbienne

Les résultats relatifs aux traitements biologiques par le biais du biopesticide à base de *B.thuriengisis* par deux modes d'action (activité volatile et avec adsorption) ont montré une toxicité temporelle plus ou moins similaire. Les applications réalisées ont enregistré une efficacité au bout de 7 jours de traitement. L'effet antifongique enregistré sur les différents isolats fongiques s'est régressé au bout de 10 jours. Les mêmes résultats nous ont permis de signaler une gradation de toxicité allant de la dose complète (D1) puis la demi dose (D2) et enfin l'un quart de dose (D3). Ces résultats nous poussent à suggérer deux hypothèses.

Le premier est relatif à l'efficacité antifongique du biopesticide d'origine microbienne entre les modes d'action testés, la substance testée a eu un effet sur la croissance mycélienne du champignon. Cependant, le mode d'action par dilution avec le milieu gélosé a montré une action inhibitrice plus au moins importante que l'activité volatile présentant un pourcentage d'inhibition plus élevé.

La seconde hypothèse qu'on peut avancer, la reprise de la croissance mycélienne peut être attribuée à la production des mycotoxines par le genre *Aspergillus*.

D'après Hibar et *al.*, (2007) ont signalé qu'*In vitro*, le produit à base de *B. thuringiensis* a entraîné une inhibition de la croissance mycélienne inférieure à 20%. Sur les espèces de *Fusarium*, L'efficacité de ces produits était plus marquée dans les essais de lutte conduits *in vivo* sur des plants de tomate inoculés avec le pathogène. En effet, par l'utilisation du produit à base de *B. subtilis*, la réduction de l'incidence de la maladie (fusariose) a dépassé 95%. Ces résultats montrent que l'utilisation de certains produits biologiques pourrait lutter contre la fusariose des racines et du collet de la tomate.

Des observations microscopiques, réalisées par Hibar (2007) pour le produit testé contre *F. oxysporum f. sp. radicans-lycopersici*, ont montré que, malgré un pourcentage d'inhibition faible, le *B. thuringiensis* a causé une modification morphologique du mycélium du *F. oxysporum f. sp. radicans-lycopersici*. En effet, ce dernier est devenu plus filiforme avec présence d'une lyse souvent importante de son contenu cytoplasmique.

Les travaux de Niknejad et *al* en 2010 sur le biocontrôle des Pseudomonas ont montré que les isolats *P. fluorescens* et *Bacillus cereus* étudiés ont un excellent potentiel pour être utilisés comme agents de lutte biologique contre le pourrissement de la racine du Murier.

En effet, Daami-Remadi et El Mahjoub (1997) ont mentionné que le *B. thuringiensis* s'est montré efficace contre les *Fusarium* responsables de la pourriture sèche de la pomme de terre en réduisant de 50% l'incidence de la maladie *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que tous les isolats testés après traitement et après 10 à 15 jours d'incubation, ont repris leur croissance mycélienne, Dans la littérature le genre *Aspergillus* est connu par ces potentialités productives en matière de mycotoxines, ces substances sont des agents contaminant les produits alimentaires y compris les céréales, ce qui induit un danger fatal à la santé humaine et animale.

D'après Diener et Davis (1966) trois facteurs influencent la production de aflatoxines, physique, nutritif et biologique, parmi les facteurs physiques (température, humidité et le PH), ce même auteur a mentionné que les taux d'humidité élevés favorisent la sécrétion des mycotoxines. Les travaux de Diener et Davis (1966) ont aussi rapporté que la présence du CO₂ et O₂ favorisent le développement des *Aspergillus* et stimulent la sécrétion des mycotoxines. Ces deux molécules

existaient sur les graines testées dans notre étude suite aux fonctions vitales du charançon du riz

Les résultats obtenus de cette étude indiquent que les concentrations les plus élevées pour le biopesticide testés à savoir (D1) inhibent plus efficacement que lorsqu'elles sont diluées. Cette efficacité se traduisant par une sensibilité des champignons testés à l'augmentation des doses, où le diamètre des colonies se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose.

En revanche, la baisse du pourcentage d'inhibition va de paire avec la réduction de la concentration des doses de biopesticide utilisé. Nos résultats concordent avec ceux de Benamarouche (2010), Tafifet (2010), et Baba aissa qui ont montré que la concentration pure des extraits végétaux présente le pourcentage d'inhibition le plus important alors que les autres concentrations ont montré une activité modérée.

De ce que nous avons pu avancer comme résultats, les isolats fongiques ont montré une moyenne sensibilité vis-à-vis le biopesticide d'origine microbienne.

Conclusion et perspectives

Conclusion

La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréaliennes (Bonjean et Picard, 1990), comme le blé, l'orge, le maïs, le sorgho et autres.

La détérioration de ces derniers au cours de leur entreposage due à plusieurs agents tels que les vertébrés, les insectes et les moisissures.

Au cours de notre étude, nous avons essayé de contribuer à l'évaluation de l'effet antifongique d'une bactérie entomopathogène très connue par ses efficacités phytosanitaires dans le monde agricole.

D'autre part, un isolement d'une gamme d'isolat fongique a été obtenu à partir des graines de blé tendre infesté par un ravageur primaire de denrées stockées, appartenant à la famille des curculionidés, le charançon du riz.

Les résultats des isollements ont révélé la présence d'une mycoflore diversifiée, dominée par la présence du genre *Aspergillus sp* connu par sa forte contamination aux denrées alimentaires, ce genre est parmi les principales moisissures responsables de la sécrétion des mycotoxines dans le blé tendre stocké.

Aspergillus sp a été détecté sur les trois variétés de blé tendre analysés avec une fréquence et une abondance élevée suivies par le genre *Fusarium* qui est le moins fréquent.

En effet, le biopesticide d'origine bactérienne utilisé dans ce travail a montré une efficacité fongicide à travers deux modes de traitement ; par activité volatile et dilué dans le milieu gélosé, des résultats plus ou moins importants ont été enregistrés avec le deuxième mode de traitement (dilué avec le milieu gélosé).

Les résultats obtenus de cette étude indiquent que les concentrations les plus élevées pour le biopesticide à savoir (D1) et (D2) inhibent plus efficacement que la (D3). Le diamètre des colonies mycéliennes se réduit à chaque fois que la dose est augmentée. En revanche, la baisse du pourcentage d'inhibition à la fin du suivi peut être expliquée par la sécrétion des mycotoxines par les espèces d'*Aspergillus* sachant que ces dernières sont très connues par leurs potentialités.

Il est à rappeler que cette étude de l'effet fongicide constitue une première étape dans la recherche de molécules biocides d'origine microbienne, elle mérite d'être poursuivie par des études *in situ* pour confirmer leur activité

A partir des résultats obtenus dans cette étude il en ressort une certaine efficacité du biopesticide d'origine microbienne sur les deux isolats fongiques.

Il serait donc intéressant de :

- Isoler autres bactéries appartenant de cette du territoire national à fin d'avoir des souches locales
- Testées ce genre de Bactérie sur les bioagresseurs qui menacent les cultures agricoles
- Orienté les recherches vers les PPGR
- Chercher d'autres microorganisme efficaces et sans aucune menace sur la santé humaine et l'environnement
- Mené des études sur des graines de blé importé
- Cibler la flore Algérienne et chercher des molécules bioactives d'origine végétale.

Références

1. **Agrawal P.W., 1992**-L'entreposage des semences .Technologie de la production de semences .Eds.Srivastava J.P.Simarski L.T.Icarda ,Alep,Syrie.p.246-252.
2. **Alane F. et khalfoui A. ,2005** :Contribution a la détermination de la sensibilité des céréales poste- récolte (blé dur –blé tendre ,triticale) a l'attaque de ravageur de ravageur sitophilus oryzae et de l'effet de l'infestation sur la qualité de blé dur (triticum durum desf) thèse d'ing
3. **Al-reza S.M., Rahman A., Ahmed Y., Kang S.G., 2010**- Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology 96 : 86–92.
4. **Alex D et Maurice T,1993**- Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chauds,(institut français de recherche pour le développement en coopérative centre technique de coopération agricole et rurale)43-353pp
5. **Appert J .,1985**-Le stockage des produits vivriers et semenciers.Ed .Maisonneuse et Larose,Paris,133P
6. **Aoues K,2010** :Amelioration des techniques de stockage du blé pour la preservation contre les attaques de Sitophilus
7. **Anonyme, 2005** - Université Pierre et Marie Curie UFR des sciences de la vie. <http://www.museums.org-za/bio/insects> home.htm.
8. **Anonyme(a), 2007**- la lute antivectorielle dans le cadre de l'épidémie de chikungunya sur l'île de la réunion ; Evaluation des risques et de l'efficacité des produits larvicides.AVIS de l'Agence française de scurité sanitaire de l'environnement et du travail (afsset). Maisons-Alfort cedex,115p
9. **Anonyme(b), 2007**-<http://scf.rncan.gc.ca/soussite/cfql> *Bacillus thurigiensis/ bacteriespathogenes* :
10. **Anonyme, 2008**-fiche techenique : la mineuse de la tomate *Tuta Absoluta* (Meyrick), FREDON Corse ? France.3p, in http://www.fredon-corse.com/ravageurs/Tuta_Absoluta.htm
11. **Anonyme, 2009**- Charançon des grains, Google, <http://www.ipmimages.org>

12. **Bajpai V.K., Rahman A., Ahmed Y., Kang S.G., 2007-** Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Industrial Crops and Products* 26 : 28–35.
13. **Bauce R., Carisey N., Dupont A. et Van Frankenhuyzen K., 2004-** *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 1624-1634.
14. **Balochowsky A.S., 1936.** Entomologie appliqué à l'agriculture. Traoté, Tome I, Coléoptères. Ed. Masson et Cie. Paris. 874-1222
15. **Belyagoubi L., 2010-** effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales diplôme magister en biologie Tlemcen P10.
16. **Benamarouche S., 2010** - Pouvoir biopesticide d'une gamme de plantes spontanées à l'égard d'une collection de champignons.
17. Mém. ING. Univ. SAAD DAHLAB de Blida, 145 p.
18. **Benazzeddine S., 2010** : Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera ; Curculionidae) et *Tribolium confusum* (Coleoptera; Tenebrionidae) , Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach Algérie - Ingénieur d'état en sciences agronomiques.
19. **Bonjean et Picard ,1990** :Les céréales a paille :origine économie France soft Word groupe ITM
20. **Borror D., 1981** - An introduction to the study of insects. Fith edition Saunders College Publishing 442-454.
21. **Brahimi KH., 1998** - Etude préliminaire de l'activité biologique d'une action *Omycetale Bacillaceae, Bacillus subtilis* sur *locusta migratoria* (Orthopte, *Oedipodinae*) au laboratoire. Thèse Ing., Inst. Nat .Ens. Sup. Univ. Sci-Thech . Blida, 60 P.
22. **Cangardel K., 1978** - Facteurs favorables au développement des insectes et des acariens. 83-98 In Scotti, G. Les insectes et les acariens des céréales stockées Eds. AFNOR - ITC; 237 p
23. **Chadefaud M. et Emberger L., 1960-** Traité de botanique. Systématique. Les végétaux vasculaires par L. Emberger. Fasciculé Masson et Cie. Tome II, 753p.

24. **Charles V., et Coderre D., 1992** - La lutte biologique. Ed: I.N.R.A, 671P.
25. **Cheftel J.C., et Cheftel L. H., 1977** : Introduction à la technique alimentaire
Vol 1 Ed. Lavoisier. Paris. 280-284
26. **Chevalier P. ; ST-laurent I.; et Samuel O., 2002** - Larvicides pour contrer la transmission du virus du nil occidental chez les humains. Rapport final de direction des risques biologiques environnementaux et occupationnels. Institut national de santé publique, Québec. 46p.
27. **Chutia M., Deka bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C., Boruah P., 2009-** Antifungal ion of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT- Food Science and Technology, 42 :
28. **Climent D. ,2010** -identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy
29. **Daami-Remadi M. et El Mahjoub M., 1997-**Fusariose de la pomme de terre en Tunisie: tests d'activité de quatre fongicides vis-à-vis des souches locales de *Fusarium*. Annales de l'INRAT, 70, 3-19.
30. **Diener U.L. and Davis N.D. 1966-**, Alfatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*, phytopathology, 56, 1390-1393.
31. **Dumont R., 1986** - Les céréales cultures productives. Ed : librairie Larousse, Paris, pp 15-229.
32. **Dunoyer, C., 1989-** Principes de la microbiologie en industries céréalière, Industries des céréales, pp. 13-16.
33. **Doumandji A., Doumandji S., et Doumandji Mitiche B., 2003** -Technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stock, Algérie office des publications universitaires, 67p-
34. **Doumandji –Mitiche B. et B.Doumandji S.E., 1994** - Criquet et sauterelles (Acridologie). Ed.off.Pub.Univ, Alger, 99 P.
35. **Du C., Martin P.A.W. and Nickerson K.W. 1994.** Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Applied and Environmental Microbiology 60: 3847-3853.
36. **-El lakwah F., 1990** - Fumigation experiments with phosphine in traditional mud silos in Egypt to control stored- product insects. Proceeding 5th

- international working conference on stored-product protection. Sept. 9-14. Bordeaux. Vol. II, 799-810. Eds: F. Fleurat-Lessard et P. Ducom.
37. **Ferris, H., and Zheng, L. 1999-** Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology 31:241–263.
 38. **Feillet P. 2000.** Le grain de blé : composition et utilisation. INRA. Paris, 6-308PP
 39. **Fleurat-Lessard. F., 1982-** entomologie des céréales et dérivés et autre contamination d'origine animale *in* : conservation et stockage des grains et graminées et produits dérivés, Ed Lavoisier et Apria, Paris, 192-220
 40. **Fourar .R, 1994 -** Variabilité de la sensibilité variétale du blé tendre à *Sitophilus oryzae* (Col : *Curculionidae*) dans le grain et de *Tribolium confusum* Duval (col : *Tenebrionidae*) Dans la farine. Analyse des relations éco-physiologiques insectes- grains des grains. Thèse Mag.ScienceAgr.Protec.des Vegt. INA, EL Harrach. Alger : 212p.
 41. **Inouye S., Uchida K., Maruyama N., Yamaguchi H., Abe S., 2006-** A novel method to estimate the contribution of the vapour activity of the essential oil in agar diffusion assay. Jpn. J. Med. Mycol, '47 : 91-98.
 42. **Glastonnes S., 1960-** Textbook of physical chemistry .2nd Ed. Mac Millan and Co., Ltd, London.
 43. **49-GLATRON M.F, LECADET M.M., DEONDER R., 1972.** Structure of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* Berliner : characterization of a repetitive subunit. Eur J. Biochem 39, 330-338
 44. **Gilbert J., Jordan., Somers D.J., Xing T. & Punja z.K., 2006-** Engineering plants for durable disease resistance. In : Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 225-258.
 45. **Gough M et Uisoc., 1987-** Conservation current in bulk grain. Sci. Vol. 27, PP. 29-37
 46. **Griffitts et Aroian 2005-** Many roads to resistance : how invertebrates adapt to Bt toxins. BioEssays 27, pp : 614-624
 47. **Guiraud J.P., 1998 -** Microbiologie alimentaire Ed. Dunod 648p
 48. **Jaoua S., 2005 -** Savoir plus: les biopesticides. Bulletin du CBS, Centre de Biotechnologie de Sfax, N°2, Sept 2005. p15.

49. **Jean-Charles Cote et Kwang-Bo Joung 2000** : Centre de recherche et dédéveloppement en horticulture, publications gratuites, http://res2.agr.ca/stjean/publication/gratuite-free_f.htm
50. **Hibar K., Mejda Daami-Remadi M. et El Mahjoub** Tropicultura, 2007 croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* P25, 3, 146-152
51. **Kellou R., 2008** – Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréales français dans le cadre du pole de compétitivité Quasi-Méditerranée. La cas des coopératives Sud céréales, Groupe coopératif Occitan et Audecoop-Montpellier. (Master of science, **IAMM, 2008**, Série Thèses et Masters n°93). 168p
52. **Kodio O., 1989** – Structures paysanes de stockage. P 19 In céréales en régions chaudes : Conservation et transformation. Activité scientifique AUPELF.
53. **Kouassi M., 2001**- Les possibilités de la lutte microbiologique, emphase sur le champignon entomopathogènes *B. Bassiana*. Vertigo - La revue en sciences de l'environnement sur le WEB, Vol 2 (N°2), Oct. 2001.
54. http://www.vertigo.ugam.ca/vol2no2/art3vol2n2/mathias_de_kouassi.html
55. **Kossou D. et Ahon., 1993-Stockage** et conservation des grains alimentaire tropicaux. Ed. Flomboyant., Benin. 125P.
56. **Kranz J., Schmutierer., Hand Koch W., 1977** - Diseases Pest and Weeds in tropical crops. V. Parey. Berlin. 666 p
57. **Lacoste P., 1970** : La défense des cultures à Madagascar. 190-191
58. **Larpent, J. P., 1990**- Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2^e édition. Masson, Paris. 512 pages.
59. **Lepesme P., 1944** - Les Coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels. Encycl. Entomol. A : 22 – 249p
60. **Mathlein R., 1938** - Uundersokningar rorand forradsskadedjur. 1Kornarveln, (*Calandra granarius* (L) och risviveln, *C. oryzae*(L) Derasbiologi och bekanipning. Nat Swed. Inst. Plant Prot 23.
61. **Mills, J.T., 1990**- Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. Can. J. Physiol. Pharmacol 68, 982-986.

62. **Multon J. L., 1982** - Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés- Céréales, oléagineux protéagineux, aliment pour animaux. Technique et documentation Lavoisier Paris Apria. Volume 1, 576p
63. **Ngamo L.S.T., Hance T.H., 2007** - Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. Tropiculteur 2007, Vol 25 N°4.
64. **Niknejad M. Kazempour; Kamran E. et Merat A., 2010**- Biological control of root rot pathogens in mulberry by antagonistic bacteria = Lutte biologique contre les pathogènes du pourrissement de la racine chez le murier avec des bactéries antagonistes
65. **Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D., Dixit S.N., 1982**- Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris* Roxb. (Compositae). Angerwandte Botanik, 56 : 256-257.
66. **Perry J.J.; Staly J.T et Lory S., 2004** – Microbiologie : cours et questions de révision. Ed. : DUNOD, Paris, 891p.
67. **Philippeau, G., 1986**- Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. I.T.C.F., Paris, 63 pp.
68. **Prats H., 1960** - Vers une classification des graminées. Revue d'Agrostologie Bull. Soc Bot. France: 32-79.
69. **87-Pomeranz, 1988**, Chemical composition of kernel structure. Wheat : chemistry and technology. Volume 1 ; 97-158.
70. **Rampersad J., Khan A. et Ammons D. 2003**. A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. Current Microbiology 47: 355-357.
71. **Regnault-Roger, C., Philogène, B.J.R., 2005**- Evolution des insecticides organiques de synthèse. Dans : enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement ; (eds. Regnault-Roger, C., Fabres, G., Philogène, B.J.R.). Edition TEC et DOC. Paris. pp : 20-43.
72. **Saraoui T, 2011**- Etude de la variabilité morphologique de la population F2 de blé dur (*Triticum durum* Desf.) : utilisation d'un indice de sélection d'un indice de sélection, Mém-Ing , université de Hadj Lakhdar ; Batna, Algérie, 80p
73. **Saravanakumar, D., Vijayakumar, C., Kumar, N. and Samiyappan, R., 2007**- PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. Crop Protect. 26(4):556-565.

74. **92-Scotti G.,1984**-Analyse physique des grains in Godon B et Loisel W.,1984- guide pratique d'analyse dans les industries des céréales .Ed.Techn .Doc.Lavoisier .,Paris,pp107-152(Mills ; 1990)
75. **Sharma N., Tripathi A., 2006**- Fungitoxicity of the essential oil of *Cinensis* citrus on post-harvest pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(6) : 587-593.
76. **Silva G, H., Costa J.N , Campos V.P, Oliniera D.F., Pfenning L.H,2001**- Fungal metabolites wilt-activity against nematodes.Bioactive Fungal Metabolites. Impact and Exploitation, Internationa symposium.Br. Mycolog.Soc., Wales Swansea, UK, pp:95.
77. **Silvy, C. et Riba, G., 1999**- Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaises herbes. Les dossiers de l'Environnement, INRA 19, 157-200.
78. **Steffan J-R ., 1978** - Description et biologie des insectes. In: les insectes et les acariens des céréales stockées (SCOTTI G).Ed. A.F.N.O.R. / I.T.C.F. Paris. pp8-21.
79. **Soltner D., 2005**- les grandes productions végétales. 20^{ème} Edition. Collection science et techniques agricoles.
80. **Surget et Barron, 2005** : Histologie du grain de blé, industrie des céréales 145,4-7
81. **Tafifet L., 2010** - Effet bactéricide fongicide et nématocide in vitro de quatre espèces végétales spontanées. Mém. de Magister,
82. Spécialité : Protection des plantes et environnement. Univ. SAAD DAHLAB de Blida, 164 p.
83. **Thakore Y., 2006** - The biopesticides market for global agriculture use. Industrial Biotechnology. 2(3): 203-294.
84. **Terrons Gaviva Fr. et Burny Ph., 2012**- Evolution du marché mondiale du blé au cours des cinquante dernières années, Livre Blanc « Céréales » Ulg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W Gembloux.
85. **Watkinson I., 1994**- Global view of present and future markets for Bt products. Agriculture, Ecosystems & Environment 49: 3-7.

Tableau des matières

Introduction.....	1
Partie I : synthèse bibliographique	
Chapitre I : Données générales sur le blé tendre	
I.1. Importance de blé dans le monde.....	4
I.2 Importance du blé en algérie.....	5
I.3. Généralité sur le blé tendre (tritium sp).....	5
I.3.1 Description et caractères botaniques de blé tendre.....	6
I.3.1.1. Position systématique de blé tendre.....	6
I.3.1.2. Composition du grain de blé	6
I.3.1.3. Cycle biologique de blé tendre.....	7
I.4. Stockage des grains.....	8
I.4.1. Les moyens de stockage.....	9
I.4.1.1. Stockage traditionnelle du blé.....	9
I.4.2. Autres méthodes de stockage peu fréquent actuellement.....	10
I.5. Facteurs de détérioration des grains entreposés.....	10
I.5.1. Les facteurs abiotiques.....	10
I.5.1.1. La durée de stockage.....	11
I.5.1.2. L'humidité	11
I.5.1.3. La température.....	12
I.5.1.4. Les altérations mécaniques.....	13
I.5.2. Les facteurs biotiques.....	13
I.5.2.1. Les altérations biochimiques.....	13
I.5.2.2. Les altérations dues aux moisissures.....	13
I.5.2.3. Les altérations dues aux ravageurs.....	13
I.5.2.3.1. Principaux insectes des céréales stockées.....	13

Chapitre II : préparation du ravageur charançon du riz (*S. oryzae*) et la microflore qui accompagnée les grains du blé

II.Présentation du ravageur charançon du riz (<i>S. oryzae</i>).....	15
II.1.La position systématique.....	15
II.2.Répartition géographique.....	15
II.3.Description morphologique.....	15
II.4.Biologie et développement.....	16
II.4.1.Conditions de développement.....	16
II.4.2.Le cycle vital de <i>S. oryzae</i>	16
II.5.1Microflore accompagnant les grains pendant le stock.....	18
II.5.1.1.Les champignons pathogènes du blé.....	19
II.5.1.2. Classement et caractéristiques chimiques des toxines fongiques susceptibles d'être produites dans les grains et graines.....	21
II.5.1.2.1 Les aflatoxines.....	22
II.5.1.2.2 Les époxytrichothécènes.....	22
II.5.1.2.3 La zéaralénone.....	22
II.5.1.2.4 Les ochratoxines	22
II.5.1.2.5 La citrinine.....	22
II.5.1.2.6 La patuline.....	23
II.5.1.2.7 La sétérigmatocystine.....	23
II.6 Méthodes de lutte.....	23
II.6.1 Lutte chimique.....	23
II.6.2 lutte physique et mécanique.....	24
II.6.3 Lutte génétique.....	24
II.6.4 Lutte biologique.....	24
II.6.4.1Biopesticides.....	25
II.6.5 Stratégies de lutte contre les principales maladies du blé transmis par les semences.....	25

Chapitre III : présentation du biopesticide d'origine microbienne à base de *Bcillus thuringiensis*

III.1. Présentation du biopesticide d'origine microbienne à base de <i>Bcillus</i> <i>thuringiensis</i>	27
III.2. Importance du <i>Bacillus thuringiensis</i>	27

III.3. Les inconvénients.....	28
III.4. Présentation de <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
III.4.1 Historique.....	28
III.4.2 Systématique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
III.4.3 Caractères bactériologiques du genre <i>Bacillus</i>	29
III.4.4 Descriptions de l'espèce.....	30
III.4.5 Cycle biologique de <i>B. thuringiensis</i>	31
III.4.6 Les toxines de <i>B. thuringiensis</i>	33
III.4.5 Mode d'action du <i>Bacillus thuringiensis</i> et cibles cellulaires des δ - endotoxines.....	34
III.5.Utilisation de <i>B. thuringiensis</i> et de ses dérivés en tant que biopesticide	

Partie II : expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Objectifs.....	36
IV.2. Matériels d'étude	36
IV.2.1. Matériel biologique.....	36
IV.2.1.1. Matériel végétale	36
IV.2.1.2. Matériel animal.....	37
IV.2.1.3. Matériel microbiologique.....	38
IV.3. Isolement et recherche de la microflore su stockage.....	38
IV.3.1. Désinfection et isolement	38
IV.4.2. Observation et purification des cultures.....	39
IV.4. Préparation des dilutions a testés.....	39
IV.4.1. Préparations des suspensions.....	39
IV.4.2. Dilution dans un milieu gélosé	40
IV.5. Application des traitements biologiques.....	40
IV.6. Etude du pouvoir antifongique <i>in vitro</i> du <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
IV.7. Lecture des résultats.....	41
IV.7. Analyse statistique des résultats	41

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1 Evaluation temporelle du pouvoir antifongique par la méthode de l'activité volatile du produit biologique à base de *Bacillus thuringiensis* sur les isolats fongiques

V.2 Evaluation temporelle du pouvoir antifongique par la méthode de dilution dans le milieu gélosé du produit biologique à base de *Bacillus thuringiensis* sur les isolats fongiques

Discussion

Conclusion générale

Tableau de matière

Références bibliographiques

Annexes

Annexe 1

Milieu de culture utilisé :

PDA (Potato Dextrose Agar)

- 1000ml eau distillée
- 20g Agar
- 200g pomme de terre
- 20g glucose

PH 6,8 et autoclavage pendant 30 minutes à 120°C.

Annexe 2

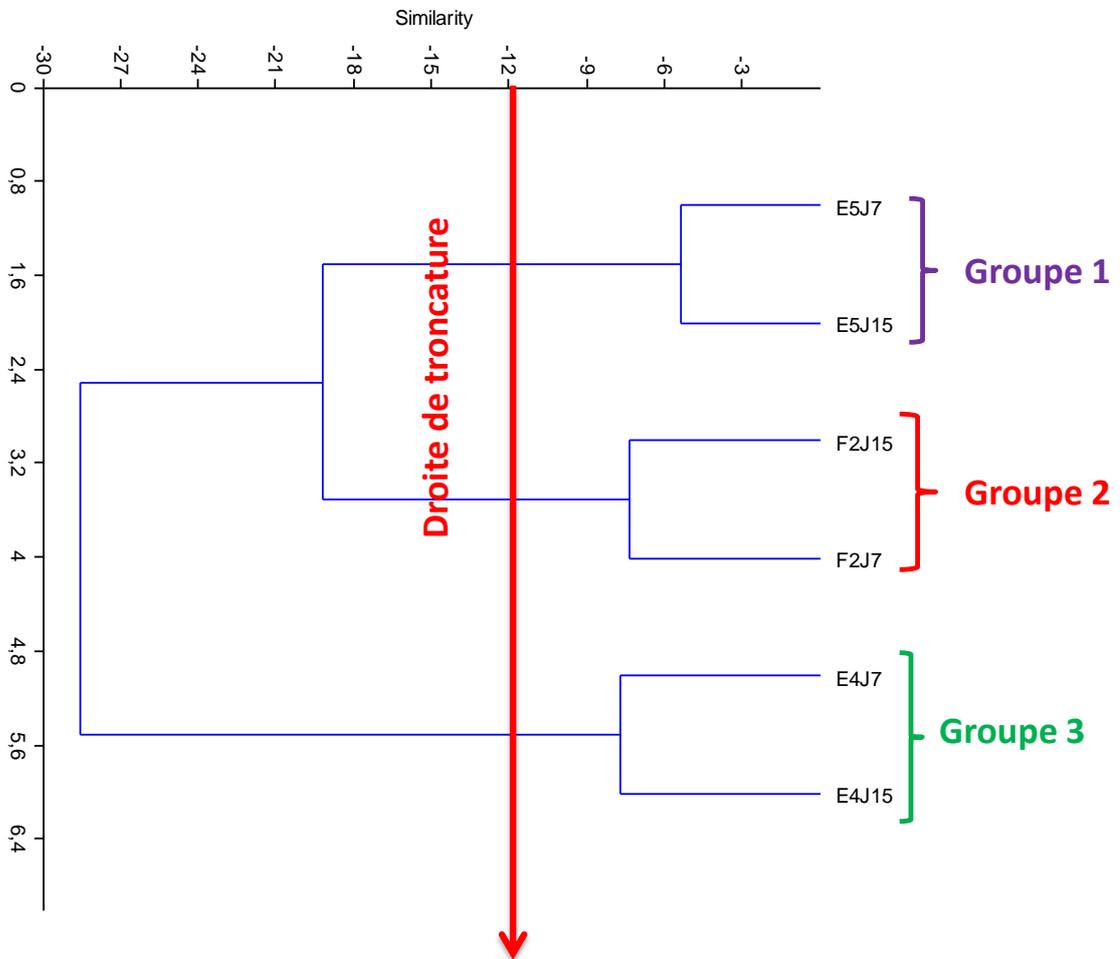


Figure : La C.H.A. (classification hiérarchique ascendant) prise à une similarité de (- 12), montre l'existence de trois groupes.

Annexe 3

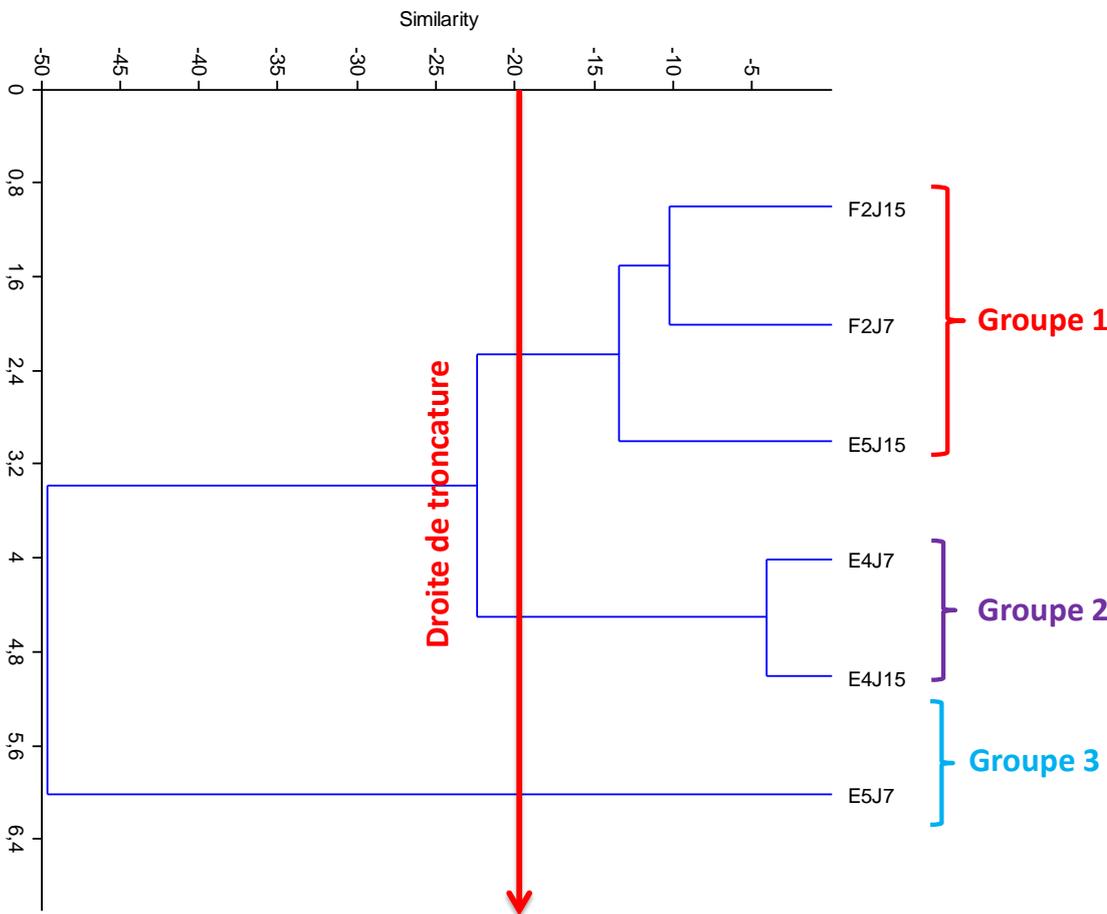


Figure : La C.H.A. (classification hiérarchique ascendant) prise à une similarité de (- 20), montre l'existence de trois groupes.

Annexe 4

Matériel de laboratoire :

- Étuve
- Hôte
- Autoclave
- Boite de pétri de 9 cm de diamètre.
- Balance
- Plaque chauffante
- Pince
- L'eau distillée
- Micropipette.
- Bec benzène
- Papier filtre
- Parafilm