

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 quelques champignons
phytopathogènes lors du stockage de blé tendre**

Triticum aestivum L.

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 : Mlle. **ZENIKERI Imene**

Devant les membres de jury composé de :

Mme. SABRI K.	M.A.A.	U.S.D.B.	Présidente
Mme. AMMAD F.	M.A.A.	U.S.D.B.	Promotrice
Mme. BENSALD 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 Boufariq 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 deux très chères sœurs que dieu vous garde pour moi « Inchallah ».

J'adresse mes profonds remerciements à mon amie et sœur Neila d'avoir partagé avec moi les bons et mauvais moments depuis notre connaissance, que dieu te garde pour ta famille.

Je remercie également ma très chère amie Soumia 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.

A Madame Amina, technicienne du laboratoire de zoologie, j'adresse ma reconnaissance pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.

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.*

A mes très chères sœurs Soumia et Fella

A mon âme sœur et unique amour Hocine

A toutes mes tantes et tous mes oncles.

A mes cousins et cousines

A mes deux amies intimes Neila et Soumia.

A toutes mes chères amies de la spécialité phytopharmacie

A toute la famille ZENIKERI et NACI

Pour leur présence à tout instant,

Pour leur soutien qu'ils m'ont apporté

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

Imene

Résumé

Effet biocide de *Bacillus Thuringiensis* sur quelques champignons phytopathogènes lors du stockage de blé tendre

Triticum aestivum L.

L'étude a porté en premier lieu sur l'isolement classique de la flore fongique des graines de blé tendre stockées. En second lieu sur l'estimation du pouvoir antifongique *in vitro*, d'un biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* sur la gamme de champignons phytopathogènes isolés, par deux modes d'actions, activité volatile et dilution avec le milieu gélosé (PDA).

Les résultats de l'isolement au niveau de laboratoire ont révélé la présence de deux espèces du genre *Aspergillus* (*A clavatus* et *A Fumigatus*) ainsi une flore accompagnatrice prédominée par le genre *Penicillium*.

Les analyses liées au pouvoir antifongique du biopesticide ont révélé un effet fongicide sur la gamme d'isolats de champignons tout le long du suivi, les taux d'inhibition enregistré avec la technique volatile varient de 8% à 31%, et de 4,5% à 45% avec la deuxième méthode de traitement

Les résultats de cette étude menée ont montré que la toxicité des différents traitements 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. Cela est attribué à la sécrétion des mycotoxines par les isolats testés.

Mots clés : Effet biopesticide, *Bacillus thuringiensis*, céréale, Champignons phytopathogènes, Inhibition, Mycotoxines.

Abstract

Biocidal effect on some *Bacillus thuringiensis* phytopathogenic fungi during the storage of wheat

***Triticum aestivum* L.**

The study focused primarily on the traditional isolation of the fungal flora of seed wheat stockées. En second on estimation antifungal potency in vitro, a biopesticide of microbial origin of *Bacillus thuringiensis* the range of plant pathogenic fungi isolated by two modes of action, volatile activity and dilution with agar (PDA).

The results of isolation in laboratory revealed the presence of: two species of the genus *Aspergillus* (*Aclavatus* et *Fumigatus* A) potentially toxin production and an accompanying flora dominated by the genus *Penicillium*.

Analyzes related to the antifungal biopesticide showed a fungicidal effect on the range of fungal isolates to follow along with inhibition rate that does not exceed between 4,5% and 45%.

The results of this study showed that the toxicity of different treatments evolves with increasing concentration of applied dose on the one hand, and a relatively regressive effectiveness over time (time after treatment) resulting in a low effectiveness of the other part. This is attributed to secretion of the mycotoxins by the isolates tested.

Keywords:

Effect biopesticide , *Bacillus thuringiensis*, cereal, phytopathogenic fungi, inhibition, Mycotoxins.

ملخص

تأثير المضاد الطبيعي

Bacillus thuringiensis

على مجموعة من الفطريات الممرضة لبذور القمح المخزنة

تركز الدراسة أولا على عزل الفطريات من بذور القمح المخزنة, و ثانيا على تقدير فاعلية المضاد الطبيعي ذو اصل ميكروبي باسيلستيغ زنسيس *Bacillus thuringiensis* وفق طريقتين: التبخر و التخفيف مع الوسط الغذائي على مجموعة من الفطريات الممرضة المعزولة .

كشفت نتائج العزل في المختبر على وجود نوعين من جنس المعروفة بإنتاج سموم فطرية تهدد نوعية الاغذية *Aspergillus* و *Pénicélium*. أظهر المضاد تأثير معتبر على معدل نمو الفطريات و يتراوح هذا المعدل بين بالنسبة للتبخر (8%-31%) التخفيف مع الوسط الغذائي بالنسبة (4,5% - 45%) وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن سمية العلاجات المختلفة تتطور مع زيادة تركيز الجرعة من جهة في حين تم تسجيل فعالية رجعية بمرور الزمن (الوقت بعد العلاج) مما أدى إلى انخفاض الكفاءة من جهة أخرى وهذا ممكن ان ينسب إلى كمية السموم المفترزة من طرف الفطريات

كلمات البحث

تأثير المبيدات الحيوية, باسيلستيغزنسيس, الحبوب, الفطريات الممرضة للنبات, تثبيط, السموم الفطرية

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Sommaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Présentation du blé tendre

I.1.Importance du blé.....	4
I.2.Origine et historique du blé.....	5
I.5.Systématique du blé tendre.....	8
I.6.Stockage et conservation du blé.....	8

Chapitre II : Présentation des moisissures

II.1.Les microorganismes.....	12
II.2.Mycotoxines et écotoxigénèse	15
II.3.Méthodologies de lutte contre les champignons phytopathogènes.....	18

Chapitre III : Présentation du biopesticide d'origine microbienne

III.1.Systématique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
III.3.Cycle biologique du <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
III.4.Les toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i> (BT).....	27

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1.Objectifs 30

IV.2. Matériels d'étude..... 30

IV.3.Isolement et recherche de la microflore su stockage..... 31

IV.6. Analyse statistique des résultats 35

Chapitre V : Résultats et discussion..... 36

Conclusion et perspectives..... 59

Références bibliographiques

Table des matières

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFB1 : Aflatoxine B1

AFB2 : Aflatoxine B2

AFG1 : Aflatoxine G1

AFG2 : Aflatoxine G2

AFM1 : Aflatoxine M1

Bt : *Bacillus thuringiensis*

CRSTRA : Centre de Recherches Scientifiques et Techniques des zones Arides

Cry : protéine cristale

FAO : Food and Agriculture Organization

ITGC : Institut technique des grandes cultures

KDa : Kilodalton

OTA : Ochratoxine A

OTB : Ochratoxine B

OTC : Ochratoxine C

PDA : Potato- Dextrose- Agar.

PFT : Pore-Forming Toxin

PI : Pourcentage d'inhibition

USDA: United States Department of Agriculture.

USD : United States Dollars

UV : Les rayons ultra-violets

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 : Coupe schématique d'un grain de blé	7
Figure I-4 : Ecosystème du grain stocké	11
Figure II-1 : le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005.....	21
Figure III-1 : <i>Bacillus thuringiensis</i> sous microscope en contraste de phase	24
Figure III-2. Une bactérie de <i>B. thuringiensis</i> en microscopie en contraste de phase	25
Figure III-3. Cristaux de <i>BT</i> observés en microscopie électronique à transmission	25
Figure III-4 : Cycle biologique des bactéries formant des endospores	26
Figure III-5 : Mode d'action des protéines Cry et mécanismes hépothétiques de résistance	28
Figure IV-1 : Mise en culture des graines sur milieu PDA	32
Figure V-1 : Forme macroscopique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (A1) et <i>Aspergillus flavus</i> (B3).....	37
Figure V-2 : Forme macroscopique de <i>Penicillium sp</i> (C2).....	37
Figure V-3: Pouvoir antifongique de <i>Bacillus thuringiensis</i> par dilution dans un milieu gélosé représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement par activité volatile.....	39
Figure V-4 : Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique A1.....	40
Figure V-5 : Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique B3.....	41
Figure V-6 : Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique C2.....	41
Figure V-7: Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques en fonction de la	

durée d'incubation par activité volatile.....	43
Figure V-8 : Effet de <i>Bacillus thuringiensis</i> par l'activité volatile (durée, dose) sur les isolats fongique par activité volatile	44
Figure V-9 : Pouvoir antifongique de <i>Bacillus thuringiensis</i> par dilution dans un milieu gélosé représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement par dilution dans un milieu gélosé	46
Figure V-10: Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique A1.....	47
Figure V-11: Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique B3.....	48
Figure V-12: Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique C2.....	49
Figure V-13 : Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation par dilution dans un milieu gélosé	51
Figure V-14: Effet de <i>Bacillus thuringiensis</i> (durée, dose) sur les isolats fongiques par dilution dans un milieu gélosé.....	52

Liste des tableaux

Tableau II-1. Principaux genres bactériens rencontrés sur le grain du blé tendre au cours du stockage	12
Tableau II-2. Les principaux mycotoxines du champ et de stockage	14
Tableau II-3. Les principales moisissures contaminant les céréales.....	16
Tableau IV-1. Origine et date d'isolement des échantillons.....	31
Tableau V-1. Résultats des tests du pouvoir antifongique de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur les trois isolats fongiques par activité volatile.....	38
Tableau V-2. Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés	44
Tableau V-3 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur les trois isolats fongiques par dilution dans un milieu gélosé.....	45
Tableau V-4: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés	52

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

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

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

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

Les maladies affectant les plantes peuvent être d'origine fongique, virale ou bactérienne. Ces organismes attaquent toutes les parties de la plante et génèrent des symptômes très variés causant des dégâts sur les cultures et par conséquent des pertes agricoles. Le contrôle de ces maladies des plantes se doit d'être efficace en utilisant des méthodes de lutte conventionnelles représentées par les méthodes physiques, chimiques, génétiques et biologiques.

À partir de la seconde guerre mondiale, l'essor de la chimie organique associé à la prise en considération des problèmes du monde agricole a débouché sur la mise au point d'un nombre sans cesse croissant de produits phytosanitaires. Ils se répartissent actuellement en une dizaine de classes, les herbicides, les

fongicides et les insecticides–acaricides, représentant plus de 90% du marché mondial (Bonnemain et Chollet., 2003)

Les méthodes de lutte chimiques sont efficaces contre les champignons par l'utilisation de fongicides alors que les maladies virales et bactériennes sont incurables et nécessitent des moyens de lutte préventifs.

L'usage des produits pesticides est en constante augmentation à travers tous les pays du monde. Selon les constatations des experts mondiaux, la demande en pesticides est telle que leur quantité de production double pratiquement tous les 10 ans depuis 1945. Ce sont les pays en voie de développement qui les utilisent de plus en plus. Au niveau mondial, la valeur marchande des pesticides est de l'ordre de 32 milliards de dollars, dont 3 milliards pour les pays en voie de développement (Bouziani, 2007)

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, comporte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et d'autre part, pour la protection de l'économie du pays, visant ainsi à diminuer l'impact des produits phytosanitaires.

Face à ces profils toxicologiques et écotoxicologiques nettement importants constatés au cours de ces dernières décennies et qui sont liés à l'accumulation des résidus de pesticides, il était urgent de développer des méthodes de contrôle et de protection plus écologiques tout comme les approches alternatives complémentaires et innovantes. Cette démarche s'inscrit dans le cadre du développement d'une protection intégrée, raisonnée ou biologique telle que l'utilisation de biopesticides.

Le biopesticide d'origine microbienne qui a connu le plus grand succès commercial, le *Bacillus thuringiensis* occupe cette dernière décennie environ 1,5 % du marché mondial des insecticides (Panneton et *al.*, 2000)

La présente étude a ciblé deux objectifs ; le premier a traité l'isolement de la flore fongique qui accompagne le blé tendre au cours de stockage collecté au niveau de trois wilayas (Médéa, Guelma et Tiaret). Le second a été orienté vers l'évaluation de l'effet antifongique *in vitro* d'un biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis* contre quelques isolats fongiques menaçant les céréales

stockées à travers deux modes d'action ; activité volatile et dilution du biopesticide dans le milieu gélosé.

PREMIERE PARTIE
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
PRESENTATION DU BLE
TENDRE

I.1.Importance du blé

I. 1.1. Dans le monde

La production mondiale du blé est dominée par un nombre restreint de pays ou groupes de multinationales agro-alimentaire, ces derniers jouent un rôle très marqué dans le marché international. Ils sont cinq grandes compagnies qui dirigent le négoce des céréales, à savoir : « CARGILL», « CONTINENTAL», «BUNGE», «DREYFUS» et «ANDRE» (Boudjemâa, 1992).

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) (Gavira et Burny, 2012).

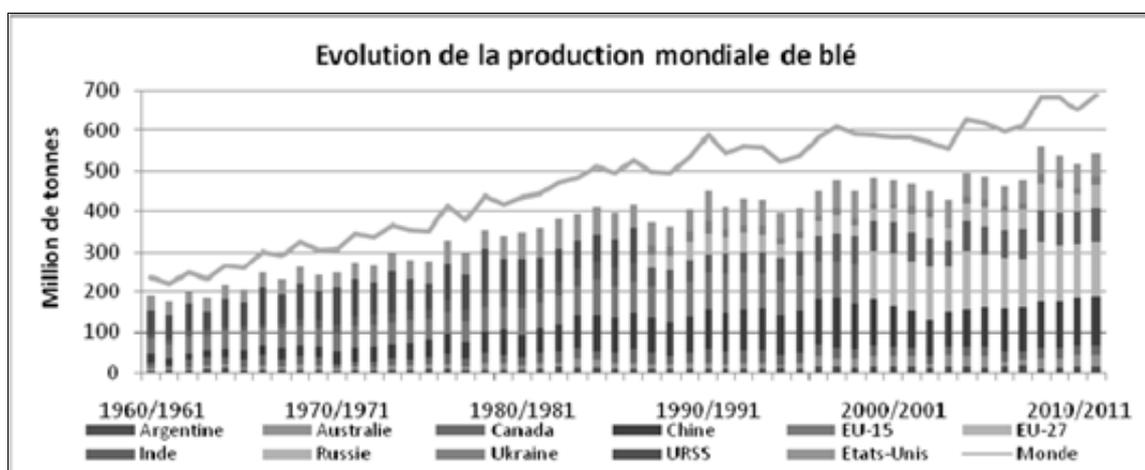


Figure I-1 : Evolution de la production mondiale de blé
(Gavira et Burny, 2012).

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) (Gavira et Burny, 2012).

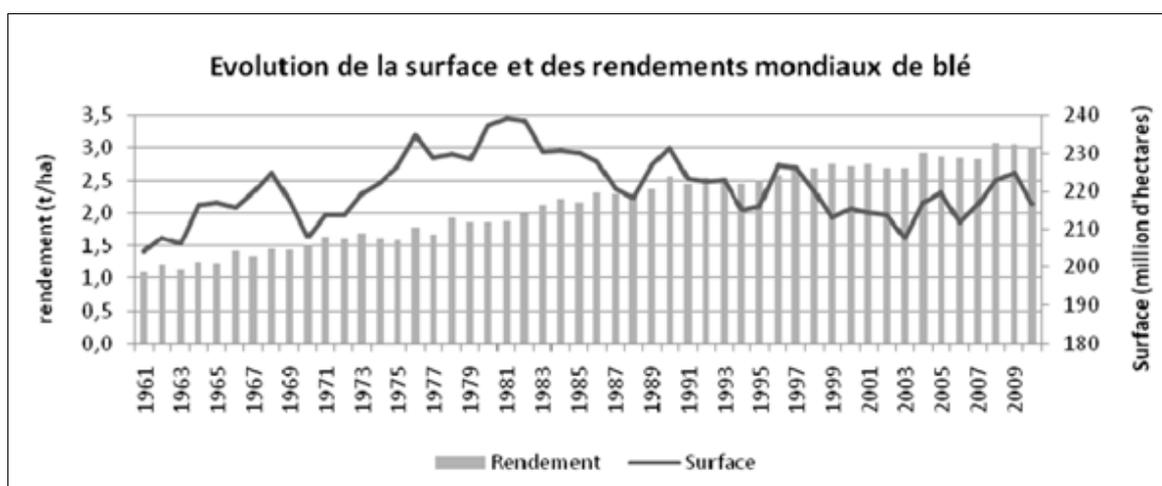


Figure I-2 : Evolution de la surface mondiale et des rendements mondiaux de blé (Gavira et Burny, 2012).

I. 1.2. En Algérie

En Algérie, les céréales sont la base alimentaire de la population (220Kg / individu / an) occupent la première place en surface agricole et une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière (Djermoun, 2009).

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. 2. Origine et historique du blé

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays du Maghreb. La filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole en Algérie. (Djermoun, 2009).

Le blé est une céréale qui appartient au genre *Triticum*; en Algérie deux variétés dominent la production ce sont le blé tendre et le blé dur (Anonyme, 2005). En Afrique, les pertes des céréales en stocks sont souvent estimés à 30% par contre dans les pays développés, elles avoisinent les 3% (Bulot, 1990).

Le blé est une céréale du mot grec Cérès qui signifie déesse des moissons, cultivé pour son grain ,dont l'albumen amylicé ,réduit en farine ,est consommable par l'homme et par les animaux domestiques (Moule ,1972).

La culture de blé remontait au néolithique, elle est largement répartie sur tous les continents, mais reste présente principalement en Europe et en Asie (Simon et *al.*, 1989). Les travaux d'archéologie menés après la deuxième guerre mondiale au proche Orient ont montré que les plus anciennes domestications de blé remontent à neuf mille ans environ, les découvertes les plus ancienne ont été faites dans le désert de Syrie ; le Kurdistan Irakien et le plateau central d'Anatolie (Harlan ,1966).

I. 3. Variétés de blé tendre cultivées en Algérie

Selon l'institut technique des grandes cultures (ITGC) en mois de février 2013, 3 à 4 variétés sur une vingtaine de variétés de blé tendre sont cultivées en Algérie (Doumandji et *al.*, 2003) ; il s'agit de :

- **Mahon Demias** : C'est un blé introduit par les premiers colons français en Algérie. Il est rustique et tardif. Doté d'une paille haute, cette variété est à semer en zones sèches et sur les sols légers.
- **Anza** : D'origine américaine (Californie), est la variété de blé tendre connu partout en Algérie. C'est une variété précoce (plus précoce que Hidhab), elle est productive grâce à son tallage épi élevé.
- **Florence Aurore** : C'est une variété qui caractérise surtout par la présence de trois arrêtes longues bien différenciées au sommet de l'épi. Elle est de moins en moins cultivée en Algérie.
- **Hidhab** : La variété précoce à paille moyenne et à épi long. Elle est résistante à la verse et à la rouille brune. Hidhab présente de bonnes caractéristiques technologiques pour la panification (Doumandji et *al.*, 2003).

I.4. Structure et Composition biochimique du blé tendre

Le grain est un caryopse de section arrondie ou ovale, de poids moyen variable selon les espèces et les variétés (Figure I-3). Dans le cas du blé tendre, le grain récolté est dépourvu d'enveloppe, il est constitué d'eau et de matière sèche, cette dernière est composée de matière minérale, et matière organique dont ces composants biochimiques avec leurs teneurs sont :

Matière sèche (88g), protéines (10g), lysine (2,6% de protéines), lipides totaux (2,4g), glucides assimilables (71,5g), cellulose brute (2,5g), minéraux totaux (1,7g) et vitamines (4,5 mg) (Adrian et Rabache M., 1988).

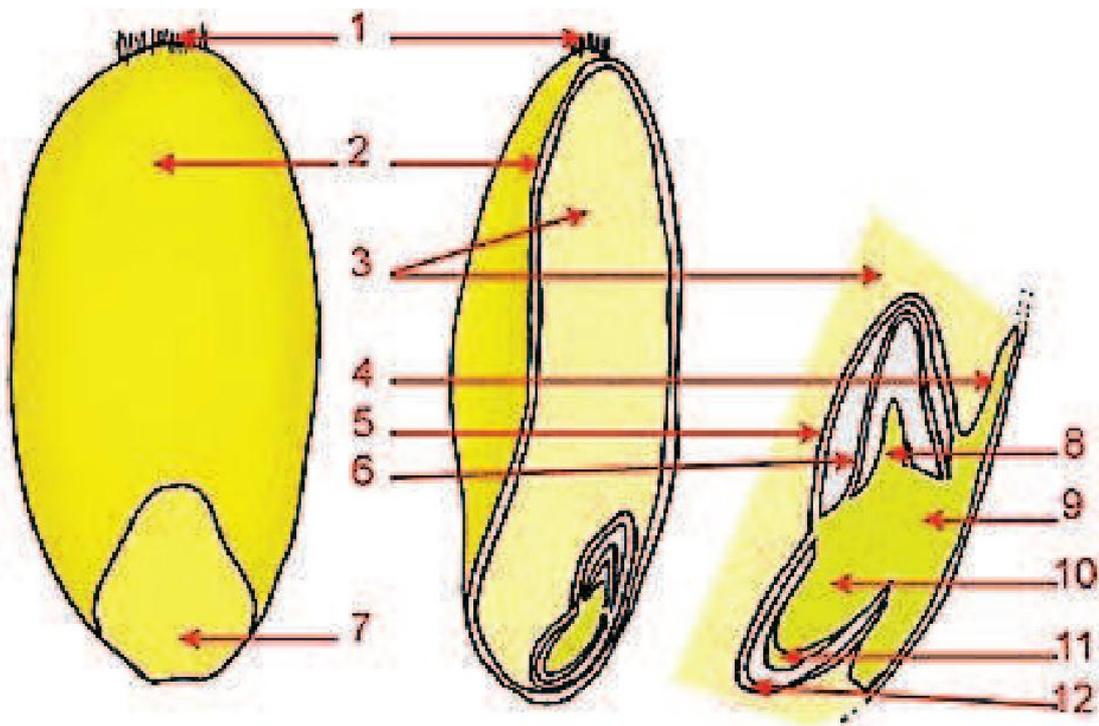


Figure I-3 : Coupe schématique d'un grain de blé (CHEFTEL et CHEFTEL, 1977).

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

I.5. Systématique du blé tendre

Les principales espèces de céréales cultivées appartiennent à la famille des poacées (blé tendre, blé dur, maïs, riz, avoine, seigle, millet et sorgho) ou des polygonacées (sarrasin) (Molinié et *al.*, 2005). D'après Chadeaud et Emberger (1960), Prats (1960) et Feillet (2000), le blé tendre appartient à la classification suivante :

Règne : Plantae (Règne végétale)

Division : Magnoliophyta (Angiospermes)

Classe : Liliopsida (Monocotylédons)

S/Classe : Commelinidae

Ordre : Poale

Famille : Poaceae (ex Graminées)

S/Famille : Triticeae

Tribu : Triticeae (Triticées)

S/Tribu : Triticinae

Genre : *Triticum*

Espèce : *Triticum aestivum* L. ou *Triticum vulgare*

I.6. Stockage et conservation du blé

La consommation quotidienne est assurée par une seule récolte, quelque fois deux dans l'année d'où la nécessité du stockage. En outre, les grains stockés sont utilisés comme des semences en attendant la saison suivante (Druvefors, 2004).

Plus l'humidité des grains est importante à la récolte, plus les conditions sont favorables au développement des microorganismes. De bonnes pratiques de conservation consistent à éviter son altération en contrôlant les principaux facteurs de détérioration (Molinié et *al.*, 2005).

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

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

Les céréales sont des produits qui peuvent être stockés à long terme et présentent une facilité pendant leurs transports (Doumandji et *al.*, 2003).

I. 6.1. 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 certaines 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. 6.2. Autres méthodes de stockage peu fréquent actuellement

Parmi les méthodes de stockage les plus utilisées 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

I. 7. Facteurs d'altération du blé tendre

I. 7.1. Altérations chimiques ou biochimiques

Lorsque le grain est soumis à des températures trop élevées (échauffement naturel ou températures trop fortes lors du séchage) il peut se produire une dégradation de la structure de l'amidon et des protéines, des pertes de vitamines et une modification d'aspect (brunissement, voire dans des cas extrêmes, noircissement du grain) (Figure I-4) (Multon, 1982).

I. 7.2. Altération d'origine mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des cassures et favorisant les autres causes d'altération (Figure I-4). L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (Afnor, 1986).

I. 7.3. 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,.....etc.

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

I. 7.4. Altération d'origine biologique

Un lot de grains entreposé comporte inévitablement au moins deux entités vivantes (Figure I-4) : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) (Multon, 1982).

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

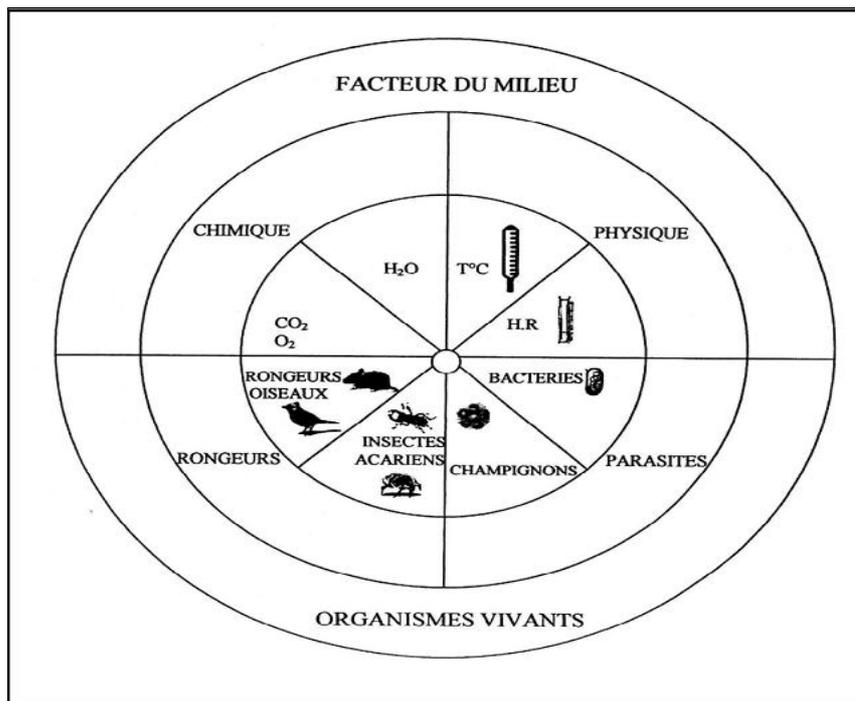


Figure I-4 : Ecosystème du grain stocké (Cangardel, 1978)

CHAPITRE II
PRESENTATION DES
MOISSURES

Les champignons phytopathogènes sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (Boiron, 2005).

Les maladies sont définies à la fois par les caractéristiques phénotypiques des agents pathogènes et par les symptômes qu'ils induisent sur les hôtes. Ainsi, la quantification des maladies s'effectue soit de manière directe en déterminant l'abondance de l'agent pathogène lui-même, soit de manière indirecte en quantifiant l'incidence de la maladie sur l'hôte, à travers la quantité de symptômes qu'il développe (Sache, 2003).

II.1. Les microorganismes

Les grains fraîchement récoltés constituent une niche écologique pour plusieurs types de bactéries (Tableau II-1). La population bactérienne est essentiellement constituée par des eubactéries qui renferment une très forte proportion d'entérobactéries, notamment de coliformes qui sont toujours abondantes sur les céréales (Withlow et Hagler, 2001).

Tableau II-1. Principaux genres bactériens rencontrés sur le grain du blé tendre au cours du stockage (Bourgeois et *al.*, 1996).

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

II. 1.1. Moisissures des céréales

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

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

Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes :

- **Les moisissures de champ** : quand les conditions sont propices au développement des moisissures, celles-ci peuvent croître sur les grains encore attachés à la plante. Le maïs et le blé sont deux exemples de grains qui peuvent contenir des niveaux importants de mycotoxines à la récolte. Parmi les genres composants cette flore, qui a besoin d'humidité pour se développer et qui régresse le plus souvent sur les grains stockés nous citons: *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Septoria*, *Verticillium*). (Tableau II-2)
- **La flore de stockage** : dominé essentiellement par les genres ; *Aspergillus* et *Penicillium* (Tableau II-2)
- Il existe une **flore intermédiaire** prédominé sur grains insuffisamment secs tel que les mucorales comme *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* et certaines levures (Magan et Lacey, 1988).

Tableau II-2 : Les principaux mycotoxines du champ et de stockage
(Anonyme, 2004).

Mycotoxines	Moisissure	Principaux substrats
Les mycotoxines du champ		
Thrichothécènes	<i>Fusarium</i>	Maïs, orge, blé, avoine
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i>	Maïs, blé, sorgho
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i>	Maïs
Les mycotoxines de stockage		
Ochratoxines	<i>Aspergillus ochraceus Penicillium viridicatum</i>	Maïs, orge, blé
Citrinine	<i>Penicillium citrinium</i>	Orge, seigle, avoine, maïs
Stérigmatocystine	<i>Aspergillus versicolor</i>	Blé
Aflatoxines	<i>Aspergillus parasiticus Aspergillus flavus</i>	Maïs, sorgho

II. 1.2. Effets néfastes des moisissures

Les grains de céréale forment un excellent milieu de culture pour les moisissures. Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, assurée par une infection des mycètes, des insectes et des acariens. Cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (Mills, 1990).

II. 2. Mycotoxines et écotoxigénèse

II. 2.1. Mycotoxines

L'enquête réalisée à l'échelle mondiale montre que 40 % des céréales sont contaminées par des mycotoxines (Jouany et Yiannikouris, 2002).

Les céréales peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage) (Pfohl-leszkowicz, 1999). Ces toxines sont des métabolites secondaires élaborées par diverses moisissures (à faible poids moléculaire $PM < 1000$ Da). Elles sont très stables dans les milieux acides et aux températures élevées, peu solubles dans l'eau et difficilement métabolisées par les organismes vivants (Adebanjo et Bankole, 2003).

La présence de moisissures ne signifie pas nécessairement la formation de mycotoxines (Pfohl-leszkowicz, 1999). Il existe des souches produisant des mycotoxines et des souches qui n'en produisent pas ou peu. La plus dangereuse de ces mycotoxines est l'aflatoxine B1 (AFB1) à cause de ces dégâts pathologiques sévères, elle est produite par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Godon et Loisel, 1997).

Les mycotoxines possèdent des effets aigus à court terme ainsi que des effets à long terme (Moll et Moll, 1995). Elles peuvent être ingérées, inhalés ou absorbés par la peau humaine. On y trouvera globalement des activités hémorragiques, immunotoxiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques, oestrogéniques, tératogène ainsi que des effets mutagènes et cancérogènes (Adebanjo et Bankole, 2003).

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Plusieurs sortes de mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires (Miller et Trenholm, 1994). Le tableau II-3 représente les moisissures et les mycotoxines détectés dans les céréales.

Tableau II-3. Les principales moisissures contaminant les céréales
(Pfohl-leszkowicz, 1999 in Molinié et Pfohl-leszkowicz, 2003)

Champignons	Toxines	Denrées alimentaires
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot	Blé et dérivés, seigle.
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (DON, NIV, toxine T-2, DAS), Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine
<i>Aspergillus</i>	Alfatoxines, Stérigmatocystine, Ochratoxine A	Mais, blé
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Ochratoxine A	Blé, riz, orge

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

II. 2.1.1. 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).

II. 2.1.2. 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 des opérations de stockages, même prolongées, ni au cours des préparations culinaires et des modalités de cuisson aux quelles les céréales sont soumises (Multon, 1982).

II. 2.1.3. 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).

II. 2.1.4. 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)

II. 2.1.5. 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).

II. 2.1.6. 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 cancérogène 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).

II. 2.1.7. 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 est peut être accompagnée d'un grand nombre de métabolites voisins (Multon, 1982).

II. 2.2. Ecotoxigénèse

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait des traitements technologiques. La sécrétion par les moisissures de métabolites toxiques dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (nature de la souche) ou bien extrinsèques (conditions de l'environnement) (Pfohl-leszkowicz, 1999).

II. 3. Méthodologies de lutte contre les champignons phytopathogènes

Les céréales constituent la base de la nourriture des populations. Les différentes méthodes présentées comme alternatives aux pesticides présentent chacune des avantages, mais aussi quelques limites. C'est là tout le sens d'une gestion intégrée basée sur la combinaison de plusieurs procédés pour circonscrire l'activité des insectes, redoutables compétiteurs de l'homme (Ketoh et *al.*, 2005). Afin de faire face à la problématique de synthétiser de façon permanente de nouvelles molécules insecticides et puisque les pesticides ne peuvent pas être abandonnés, c'est la gestion intégrée qui est encouragée Ceci rend obligatoire la découverte d'alternatives moins polluantes (Adda et *al.*, 2002 ; Ketoh et *al.*, 2005).

II. 3.1. La lutte chimique

La lutte chimique contre les champignons phytopathogènes est largement utilisée et s'est révélée depuis toujours une méthode de lutte efficace et indispensable (Pezet et *al.*, 2004).

La lutte préventive est principalement assurée par l'application de fongicides à la plante. Cependant, l'application des effets secondaires de ces produits a remis en cause leur utilisation. En effet, des études ont montré que certains produits présentent une toxicité aigüe ou chronique pour l'homme et les organismes cibles (Leroux, 2004). De plus les agents pathogènes peuvent devenir résistants à ces produits chimiques. Ceci à entrainer le retrait du commerce de certains fongicides (Panon et *al.*, 2006).

II. 3.2. 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. 3.3. Lutte physique et mécanique

Elles concernent toutes les techniques mécano-thérapeutiques susceptibles de rendre le stock sain. Elles sont recommandées pour pallier aux problèmes des résidus chimiques liés aux différents traitements chimiques appliqués aux denrées stockées (Multon, 1982).

II. 3.4. La lutte préventive

En agriculture, la lutte contre les maladies et les ravageurs des cultures se fait d'une manière préventive plutôt que curative (Brust et *al.*, 2003).

La prophylaxie représente l'ensemble des mesures pouvant être conseillées afin de prévenir ou défavoriser l'installation d'un organisme nuisible et son développement dommageable sur un territoire déterminé (Bernard et Bugaret, 2002).

Actuellement, le meilleur moyen préconisé est d'abord de limiter au maximum les sources d'inoculum primaire. Les mesures préventives s'appuient sur les techniques agronomiques approuvées qui visent à créer simultanément des conditions défavorables pour les ennemis des cultures, telles que la rotation des cultures, l'hygiène, les pratiques culturales, la fertilisation raisonnée et le travail du sol (Deguine et ferron, 2005).

II. 3.5. La lutte biologique

La lutte biologique est une méthode alternative à la lutte chimique. Les biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de microorganismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes. Ils peuvent aussi être des substances d'origines naturelles telles que des extraits végétaux ou phéromones (Thakore, 2006).

II. 3.5.1. Les biopesticides

Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74% du marché mondiale (Figure II-1). Des espèces non pathogènes appartenant au genre *Fusarium*, ainsi que les *Pseudomonas spp* et des *Bacillus spp*. Sont parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origine tellurique

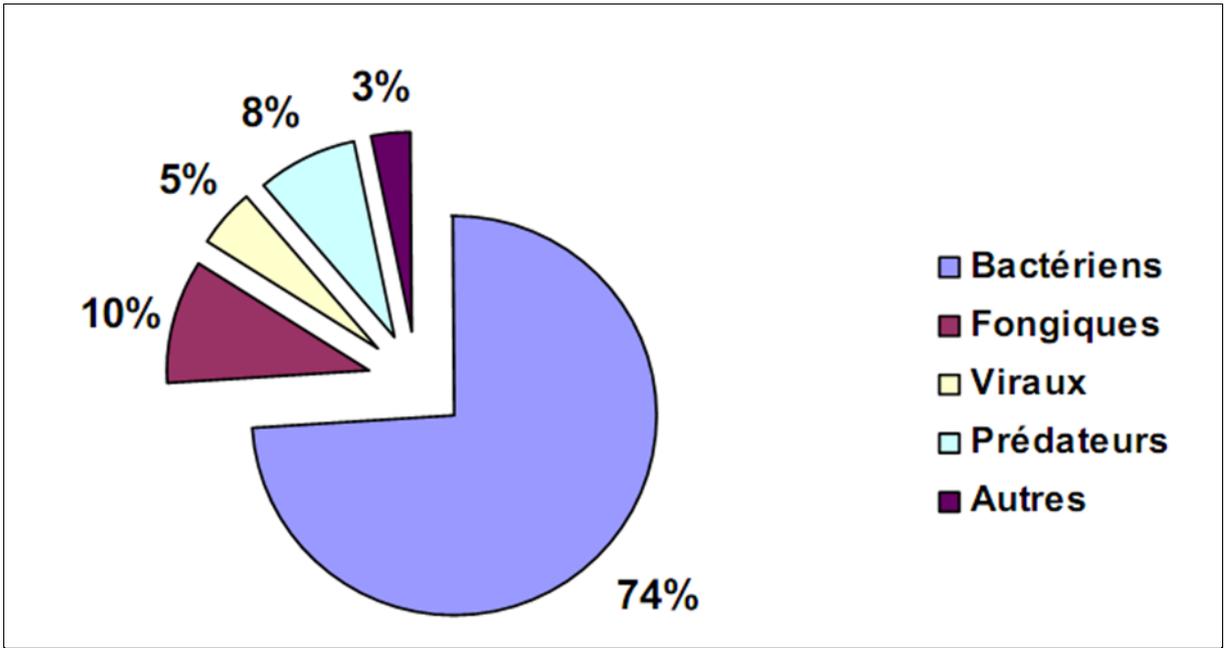


Figure II-1 : le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005
(Thakore, 2006)

CHAPITRE III

PRESENTATION DU

BIOPESTICIDE D'ORIGINE

MICROBIENNE

Cas de *Bacillus thuringiensis*

L'utilisation de micro-organismes pathogènes est devenue un domaine important de la lutte biologique. Bien que les efforts en ce sens datent d'environ 80 ans, le développement de cette méthode a été essentiellement dû à une meilleure connaissance des organismes pathogènes.

Selon Starnes et *al.*, (1993) in (Kouassi, 2001) ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae, Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae.

En 1991, les biopesticides représentaient 1 % du marché mondial des pesticides, soit d'environ 100 millions de dollars dont 90% étaient constitués par des produits à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). La répartition de ce marché est fortement déséquilibrée, en effet, l'Amérique du nord à elle seule représente plus de 50% du marché (54%), les autres régions du monde utilisent encore peu cette méthode de lutte: 23 % de parts de marché à l'Asie, 12% à l'Afrique, 8% à l'Amérique centrale et à l'Amérique latine, 2% à l'Australie et à l'Océanie et seulement 0,7% à l'Europe de l'Ouest. Aucun chiffre n'est connu pour l'Europe de l'Est et l'ex-Union Soviétique (Thakore, 2006).

Les premiers essais de lutte biologique avec *B. thuringiensis* ont été réalisés en Hongrie dans les années 1920 et en Yougoslavie dans les années 1930 pour contrôler principalement les Lépidoptères (Beegle et Yamamoto, 1992). Les résultats prometteurs de ces essais ont conduit à la production du premier produit commercial en France en 1938 par les laboratoires Libec, la Sporéine. Par la suite, un nouveau produit, le Thuricide apparut au début des années 1960 (Lord, 2005). En 1976, la découverte des sérotypes *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) et *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (*Btt*) a permis l'ouverture de nouveaux marchés, grâce à une action larvicide sur les moustiques, les simuliés et les coléoptères.

III .1. Systématique de *Bacillus thuringiensis*

Selon (Larpent, 1990) sa classification se présente comme suit :

Régne :	<i>Bacteria</i>
Embranchement :	<i>Eubacteria</i>
Classe :	<i>Sporulales</i>
Ordre :	<i>Bacillales</i>
Famille :	<i>Bacillaceae</i>
Genre :	<i>Bacillus</i>
Espèce :	<i>Bacillus thuringiensis</i>

III .2. Description et caractéristique de *Bacillus thuringiensis*

Découvert pour la première fois au Japon en 1902 dans un élevage de vers à soie (*Bombyx mori*) , *B. thuringiensis* a été à nouveau isolé en 1911 en Thuringe (Allemagne) à partir d'une population de teigne de la farine (*Ephestia kuhniella*) par Berliner qui comprit l'utilisation possible de ce germe pour lutter contre des insectes nuisibles (Josette,1995).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) est une bactérie aérobie facultative, ubiquiste, Gram positive, caractérisée par l'activité entomopathogène des corps d'inclusions qu'elle produit lors de sa sporulation. Elle fait partie d'un groupe de six bacilles, rassemblés sous le terme « groupe *Bacillus cereus* » : *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus thuringiensis*. (Figure III-1).

À l'état végétatif, *Bacillus thuringiensis* a la forme d'un bâtonnet de 5 µm de long sur 1 µm de large, et est pourvu de flagelles (Figure III-2). Elle se distingue des autres bacilles du groupe par sa capacité à synthétiser des cristaux protéiques (Figure III-3).

Bacillus thuringiensis a la particularité de synthétiser un cristal protéique lors de la sporulation. L'activité entomopathogène de ce germe est liée à la présence de cette inclusion parasporale (cristal), constituée de protoxines, appelées également delta-endotoxines. Les cristaux ont, selon les souches, une activité larvicide sur différentes espèces d'insectes appartenant à trois ordres : Lépidoptères, Coléoptères et Diptères (Josette, 1995).

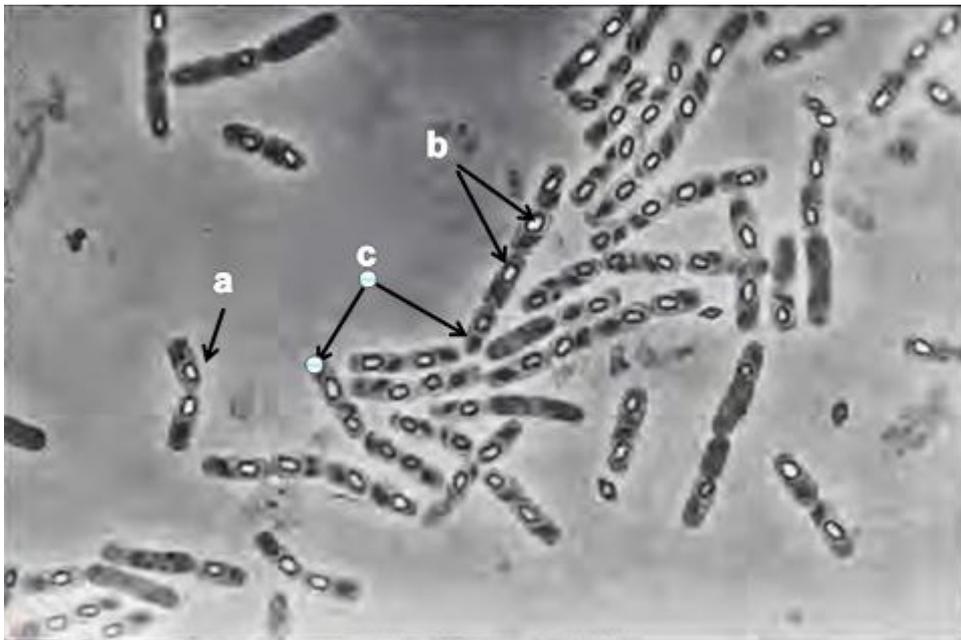


Figure III-1 : *Bacillus thuringiensis* sous microscope en contraste de phase
a : *Bacillus thuringiensis*, b : spores, c : cristaux (Rampersad et al., 2003)

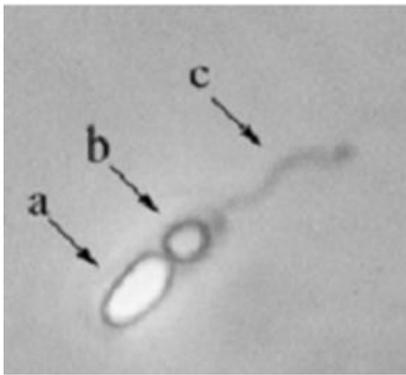


Figure III-2. une bactérie de *B.thuringiensis* en microscopie en contraste de phase ;
a : spore ; b : inclusion parasporale contenant les cristaux de protéines ;

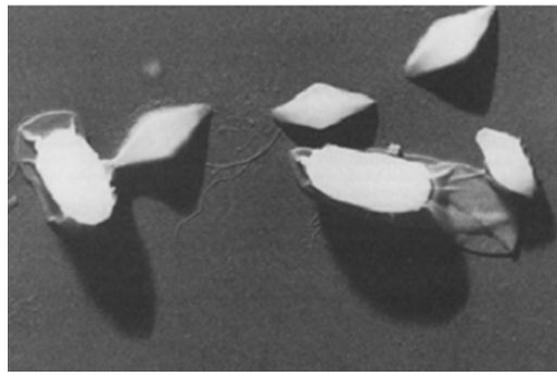


Figure III-3. Cristaux de *B.thuringiensis* observés en microscopie électronique à transmission (Du et *al.*, 1994).

III .3. 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-4).

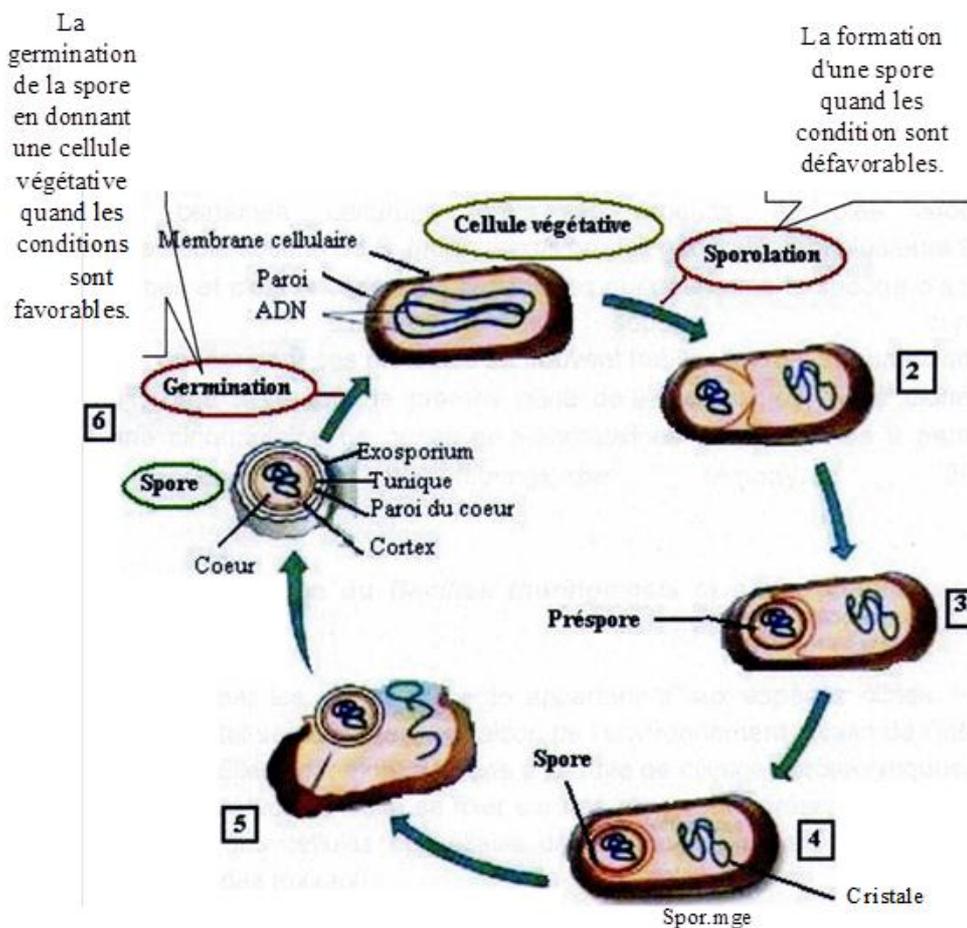


Figure III-4 : Cycle biologique des bactéries formant des endospores (Perry et al., 2004)

Légende :

- 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 préspore.
- 4 : murissières de la préspore 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'exosporium, libère le dipicolinate de calcium, et commence à ce multiplié comme la croissance végétative normale.

III. 4. Les toxines de *Bacillus thuringiensis* (BT)

Des souches de la bactérie *Bacillus thuringiensis* synthétisent divers types de protéines cristallines insecticides ou δ -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, 2007).

III. 4.1. 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* (Lacoursière J. O. et Boisvert J., 2004 in Anonyme, 2007) (Figure III-5).

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)

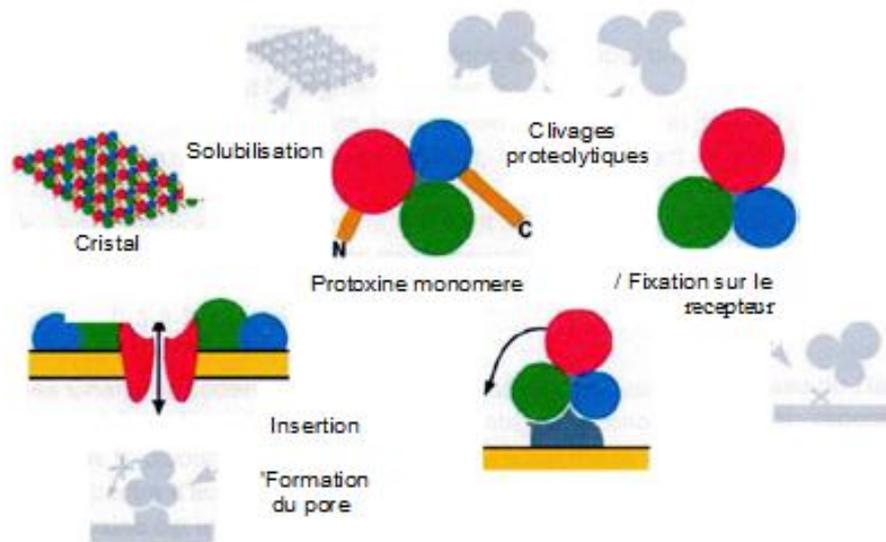


Figure III-5 : Mode d'action des protéines Cry et mécanismes hépothétiques de résistance (Griffitts et Arorian, 2005)

III .5. Utilisation de *Bacillus 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 Bt 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 *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BTK) 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 *Bt* 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.

III .6. Impact des toxines *Bacillus thuringiensis* sur l'environnement

En effet, le mécanisme d'action de *Bt* nécessite diverses étapes spécifiques et essentielles à la toxicité des protéines telles que la solubilisation, l'activation et la reconnaissance des récepteurs des cellules intestinales de l'insecte cible. De ce fait, le risque d'atteinte des insectes non cibles semble être mineur. Par exemple, une concentration de Cry1Ac 100 fois supérieure à ce qu'on peut retrouver dans les cotons transgéniques a été appliquée sur 14 espèces d'insectes (Coléoptères, Diptères, Homoptères, Hyménoptères, Lépidoptères, Neuroptères, Orthoptères) ; et seuls les Lépidoptères ont montré plus de 50 % de mortalité. Les autres espèces n'ont pas montré de mortalité significative, indiquant que Cry1Ac exprimé dans les plants de coton transgéniques a une activité biologique spécifique des Lépidoptères et que le risque d'effets indésirables sur d'autres espèces est négligeable (Sims, 1995).

Cependant, les différentes études menées afin d'évaluer l'innocuité de *Bt* envers les autres organismes ont montré des résultats contrastés.

DEUXIEME PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV .1. Objectifs

Les biopesticides d'origine microbienne peuvent constituer une solution alternative aux pesticides chimiques de ces dernières décennies. Leurs propriétés et leurs avantages écologiques et environnementaux indéniables en font des composés très intéressants pour les traitements phytosanitaires à venir.

Ce présent travail a pour objectifs d'évaluer l'efficacité fongicide *in vitro* de *Bacillus thuringiensis* sur quelques champignons du stockage de blé tendre (*Triticum aestivum*) :

- L'isolement et l'identification des moisissures à partir des échantillons des graines du blé tendre stocké.
- Préparation des dilutions à partir de *Bacillus thuringiensis*
- Essais d'activité antifongique de *Bacillus thuringiensis* 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

Précaution d'échantillonnage

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 sur 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: (Institue Technique des Grandes Cultures) d'El-Harrach, Alger (Tableau IV-1).

Tableau IV-1 : Origine et date d'isolement des échantillons (Originale 2013)

Type	Station	Date d'isolement	Référence	Variété	Origine
Blé tendre	ITGC (EL-HARRACH)	18/04/2013	A	ARZ	Guelma
Blé tendre	ITGC (EL-HARRACH)	18/04/2013	B	ARZ	Médéa
Blé tendre	ITGC (EL-HARRACH)	18/04/2013	C	AIN ABID	Tiaret

IV .2.2. 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 su stockage

5 à 6 graines ont été utilisées pour la détection éventuelle des agents fongiques des maladies de 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 un milieu de culture ; le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe A) (Figure IV-1).



Figure IV-1 : Mise en culture des graines sur milieu PDA (Originale 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

Nous préparons les doses à tester après dilution de *Bacillus thuriengisis* dans l'eau distillée stérile ce dernier est utilisé comme témoin. A partir de cette suspension, 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:

- 1^{ère} dose ; 1g de BT + 1l d'eau distillée
- 2^{ième} dose ; 0,5g de BT + 1l d'eau distillée
- 3^{ième} dose ; 0,25g de BT + 1l d'eau distillée
- Témoin : 1l d'eau distillée stérile

IV .4.2. Préparation des dilutions de *B. thurengisis* dans le milieu gélosé

Cette méthode consiste à mélanger *Bacillus thuringiensis* en poudre avec le milieu de culture stérilisé, 2 doses différentes du *Bacillus thuringiensis* mélangés avec le milieu ; 1g et 0,5g par litre de milieu de culture stérilisé. Chaque test est répété 3fois. Le témoin utilisé est à base de milieu nutritif (PDA) sans Biopesticide préparé.

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 ; l'activité volatile et dilution dans un milieu gélosé (activité alimentaire).

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

Quatre 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 3 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 3 fois.

IV .5.2. 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) :

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

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 .6. 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 des souches fongiques testées, nous avons utilisé la procédure décrite dans PAST vers 1.81 (Hammer et *al.*, 2001). 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, *B. thuringiensis* 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

RÉSULTATS ET DISCUSSION

V. 1. Recherche des flores fongiques du stockage

Les isollements ont été réalisés avec les graines de trois de variété de blé tendre après 5 mois de stockage. Aucune symptomatologie n'a été manifestée sur les graines échantillonnées, nous avons relevé un développement d'une flore fongique accompagnée d'une flore bactérienne. Parmi les genres fongiques les plus rencontrés nous citons ; *Aspergillus* et *Penicillium*. Les différents isollements réalisés ont permis de purifier quatre isolats présentant des caractères cultureux ressemblant à ceux cités en dessus.

V. 1.1. Caractères morphologiques des champignons isolés

Sur le milieu PDA, le genre *Aspergillus* est représenté essentiellement par trois espèces, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (Figure V-1) Accompagne par une présence assez faible du genre *Penicillium* (Figure V-2).

a. *Aspergillus sp*

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

- 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 (Figure V-1)
- Conidie : claviformes dressées, bleu vert à vert-olive, forme typique de massue à l'état jeune puis se séparant en plusieurs colonnes de chaînes conidiennes divergentes à maturité se terminant par une vésicule renflée.

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

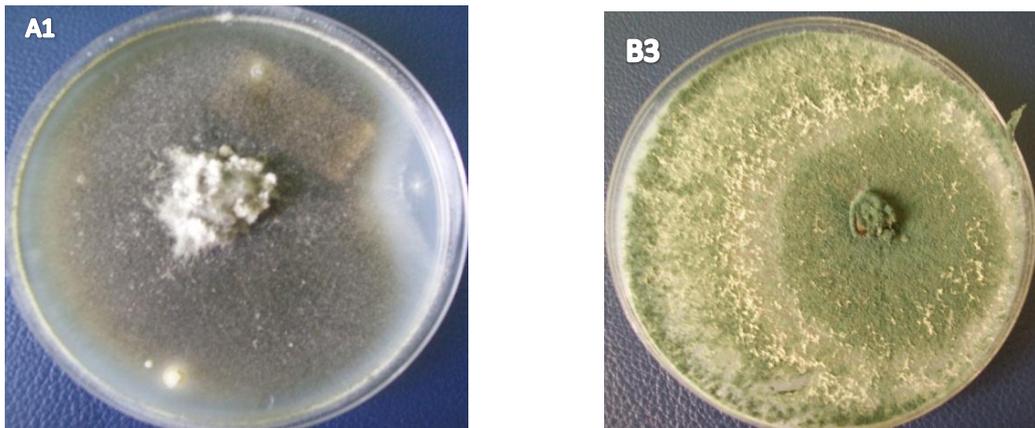


Figure V-1 : Forme macroscopique d'*Aspergillus fumigatus*(A1) et *Aspergillus flavus*(B3) (originale 2013)

b. *Penicillium sp*

- Caractères macroscopiques :

Les colonies sont généralement à croissance rapide, dans les tons de vert, parfois blanc, principalement constitué d'un feutre dense de conidiophores.

- Caractères microscopiques :

Au microscope, les chaînes de conidies unicellulaires sont produites en succession à partir d'une cellule conidiogène

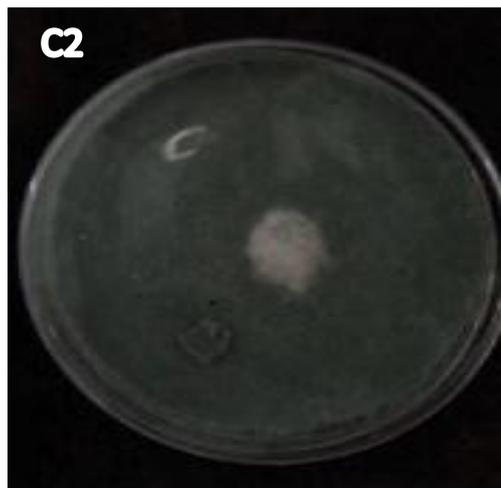


Figure V-2 : Forme macroscopique de *Penicillium sp* (C2) (originale 2013)

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

V. 2. Évaluation de l'activité fongicide du biopesticide d'origine microbienne (à base de *B. thuringiensis*) sur les trois isolats fongiques A1, B3, C2

L'étude du pouvoir antifongique du biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* a été évaluée *in vitro* sur quatre isolats fongiques à savoir (A1, B3, C2). En utilisant deux méthodes, l'activité volatile et activité alimentaire (dilution dans un milieu gélosé).

V .2.1. Étude de l'efficacité fongicide du biopesticide d'origine microbienne (à base de *B. thuringiensis*) sur les isolats fongiques par l'activité volatile

L'étude du pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* a été évaluée *in vitro* sur trois isolats fongiques en utilisant la méthode d'activité volatile.

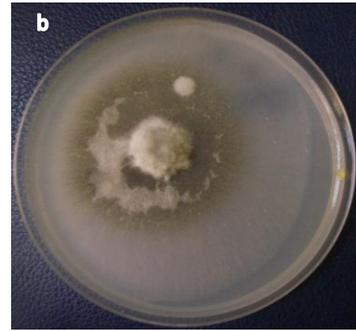
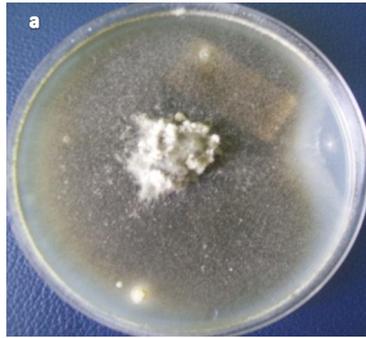
Il apparaît d'après le tableau V-1, que *Bacillus thuringiensis*, s'est révélé faiblement efficace qualitativement et quantitativement sur tous les isolats fongiques étudiés se traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes qui varie d'un isolat à un autre (V-3).

Tableau V-1. Résultats des tests du pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* sur les trois isolats fongiques par activité volatile.

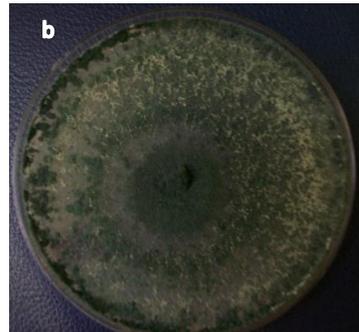
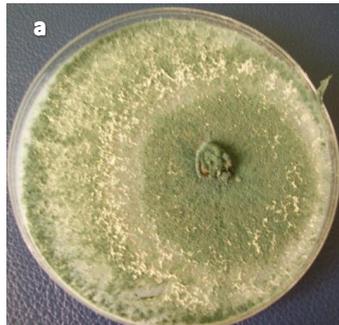
		7J				15J			
		D1	D2	D3	TM	D1	D2	D3	TM
A1	d (mm)	58	53	51	64	78,67	72,67	71,67	80
	PI%	9,38	17,19	20,31	0	1,67	9,16	10,41	0
B3	d (mm)	69,67	62,67	57,67	76	85	74,33	68,67	85
	PI%	8,33	17,54	24,12	0	0,00	12,55	19,21	0
C2	d (mm)	57,67	52,33	75,33	76	70	63,67	85,00	85
	PI%	24,12	31,14	0,88	0	17,65	25,09	0	0

A1 : *Aspergillus fumigatus* ; B3 : *Aspergillus flavus* ; C2 : *Penicillium sp*

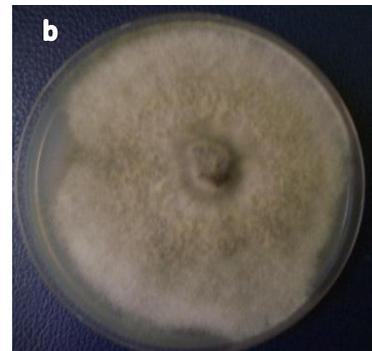
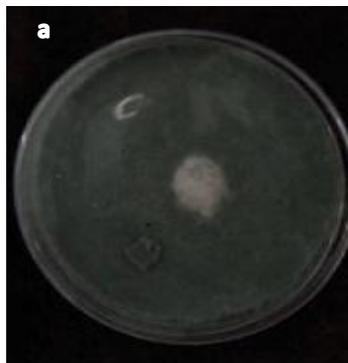
Ce tableau montre que *Bacillus thuringiensis* présente un effet antifongique faible dont les pourcentages d'inhibition ne dépassent pas les 30% pour tous les isolats fongiques.



A1. *Aspergillus fumigatus*



B3 : *Aspergillus flavus*



C2. *Penicillium sp*

Figure V-3: Pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* par activité volatile représenté par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement (originale 2013)

La lecture après 7jours : (a) le témoin, (b) le traitement

V .2.2. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur les trois isolats fongiques

V .2.2.1. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique A1

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon A1 enregistré après l'application de *Bacillus thuringiensis* montre un effet fongicide moyen des trois doses utilisées s'étalant sur une durée après traitement de deux semaines. Cependant on note que *Bacillus* appliquée avec la dose D1 montre le taux le plus faible par rapport au deux autres doses. Tandis que le pouvoir antifongique le plus élevée est noté avec la dose D3 (Figure V-4).

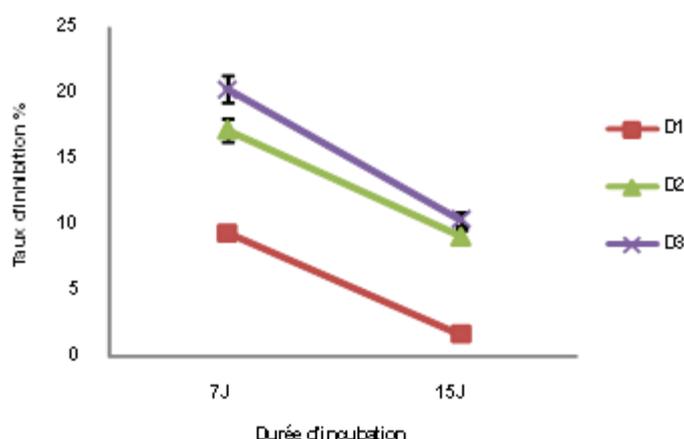


Figure V-4 : Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique A1

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

V .2.2.2. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique B3

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon B3 enregistré après traitement par *B. thuringiensis* est assez faible des différentes doses testées. Cependant on note que une régression de ce taux après 15 jours d'exposition malgré que ces doses ont montré un effet moyen après 7 jours qui varie en fonction des doses (D1 ; D2 et D3) respectivement de (10% ,15% et 25%) (Figure V-5).

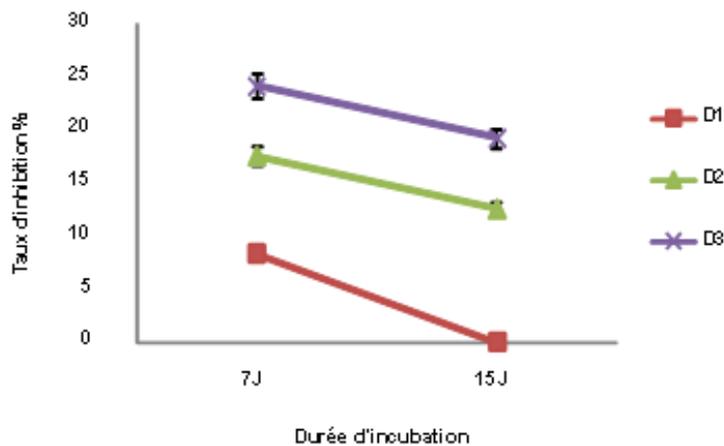


Figure V-5 : Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique B3

V .2.2.3. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique C2

L'effet du biopesticide testé sur l'isolat fongique C2 montre une évolution progressive dans le temps (7 à 15 jours) du taux d'inhibition de la croissance mycélienne pour les différents traitements appliqués mais la dilution (D1 et la D2) du biopesticide révèle après 15 jours le pourcentage d'inhibition le plus important ($PI \geq 25\%$). Tandis que la dose (D3) n'a présenté aucune inhibition (Figure V-6).

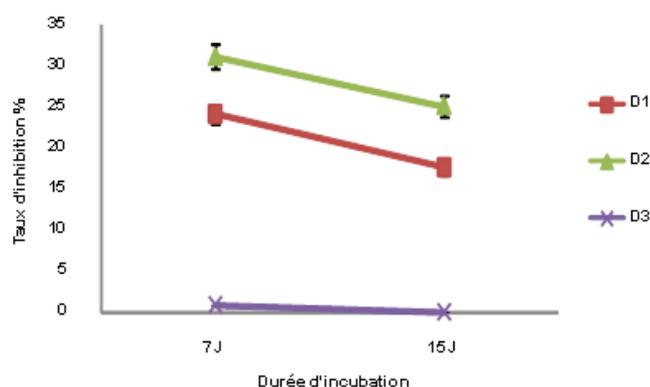


Figure V-6 : Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique C2

Une 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 isolats fongiques testés.

La C.H.A. (classification hiérarchique ascendant) prise à une similarité de (- 0,8), montre l'existence de trois groupes (voir annexe C).

Le premier groupe comprend principalement A1J15, B3J15 et qui correspondent ou champignons A1 et B3 après deux semaines, Ce groupe est corrélé négativement avec les vecteurs, c'est-à-dire les doses. Il est caractérisé par sa faible activité antifongique représentée par des pourcentages d'inhibition inférieure à 25%.

Le deuxième groupe est représenté par les champignons B3J7 et A1J7 après deux semaines, est corrélé positivement avec les doses,

Le troisième groupe inclut le champignon C2 après deux semaines, il est corrélé négativement avec les vecteurs (doses)

L'analyse multivariée sur l'axe 2 (15,58%) indique que l'effet temporel des doses D1, D2 se distinguent clairement de la dose D3.

L'effet de dose joue un rôle important. Pour la dose D3 enregistre un effet comparable, par rapport aux doses D1 et D2 qui ont un effet semblable.

La projection sur le premier axe (83,91%) montre que les deux doses D1 et D3 ont un effet comparable et les doses D1 et D2 sont corrèlent positivement, et se corrèlent négativement par rapport à la dose D3 (Figure V-7).

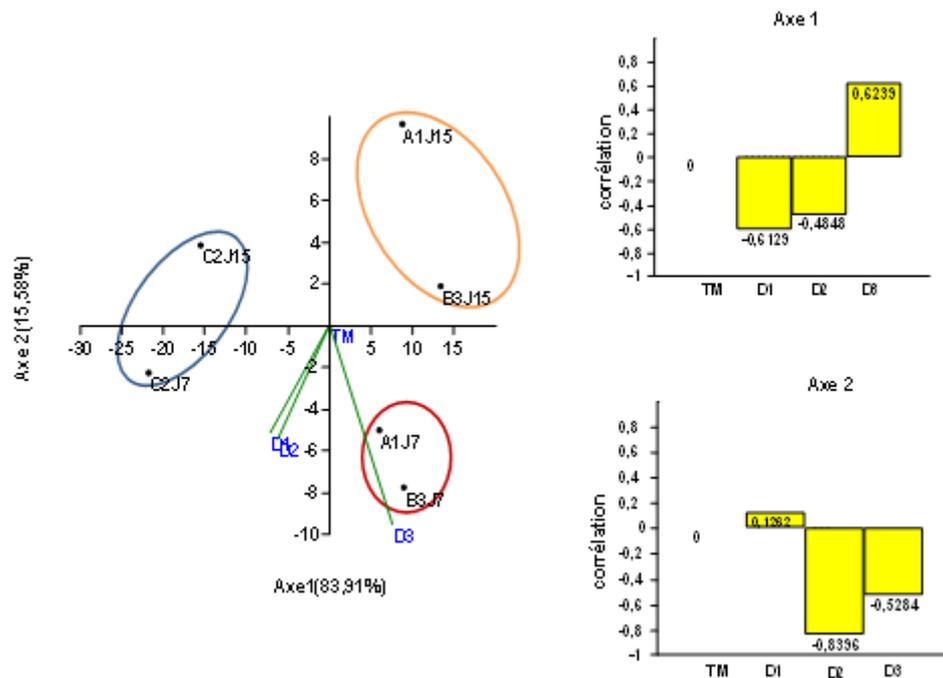


Figure V-7: Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des 3 isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation par activité volatile

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

V .2.3. Effets comparés de l'efficacité du biopesticide microbien à base de *Bacillus thuringiensis* sur les isolats fongiques

Le modèle général linéaire (G.L.M) a été utilisé afin de déterminer l'effet temporaire de traitement biologique à base de *Bacillus thuringiensis* sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques en fonction des différentes doses.

Ce modèle (tableau V-2, figure V-8), nous a permis de déduire que les effets antifongiques de traitement sont significatifs selon la concentration du produit ($P=0.019$, $F\text{-ratio}=2,643$; $P<0,05$), Quant à les isolats fongiques testés ($F\text{-ratio}=0.503$, $P=0.608$; $P>0,05$) et la durée de l'inhibition ($F\text{-ratio}=2,195$, $P=0.144$; $P>0,05$), l'effet a été non significatif.

Il ressort aussi de la figure (V-8) que les champignons A1, B3, C2, présentent une résistance importante pour les trois doses vis-à-vis au témoin en se traduisant par un pourcentage d'inhibition inférieur à 23%.

Tableau V-2: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés

facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	P
Durée	464, 817	1	464, 817	2,195	0.144
Dose	1678.483	3	559,494	2,643	0.019
Pathogène	212,800	2	106,400	0.503	0.608

P>5 %: Probabilité non significative, P<5 %: Probabilité significative ;
P<1% : Probabilité hautement significative.

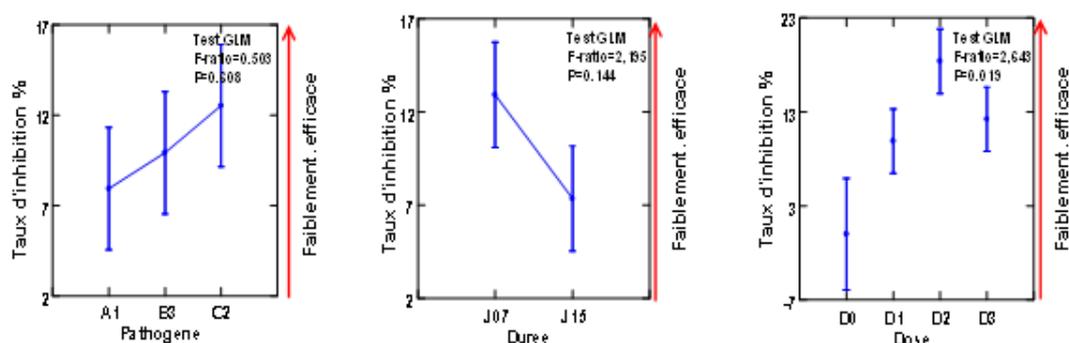


Figure V-8 : Effet de *Bacillus thuringiensis* par l'activité volatile (durée, dose) sur les isolats fongiques par activité volatile

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

L'étude de l'action antifongique de biopesticide (Bt) sur les différents isolats fongiques montre que l'isolat C2 présente une nette sensibilité à l'égard de traitement après sept jours avec un pourcentage d'inhibition le plus élevé (PI <17%), alors que les deux isolats A1 et B3 affichent des pourcentages d'inhibition plus ou moins similaires à savoir (6% < PI < 13%) (Figure V-8).

Les résultats obtenus indiquent que toutes les concentrations du biopesticide inhibent la croissance mycélienne, cette efficacité se traduit par un pourcentage d'inhibition (3% < PI < 23%). (Figure V-8).

L'évolution temporelle des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des différents isolats fongiques montre que le produit testé se révèle efficace au bout de 7 jours avec un pourcentage d'inhibition (PI=15%), puis se régresse fortement (PI>3%) (Figure V-8).

V.3. Étude de l'efficacité fongicide du biopesticide d'origine microbienne à base de *B. thuringiensis* sur les trois isolats fongiques par activité alimentaire

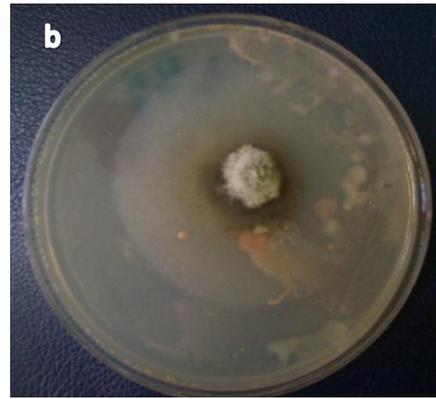
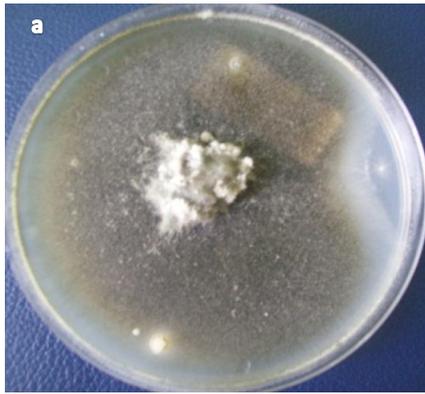
L'étude du pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* a été évaluée *in vitro* sur trois isolats fongiques en utilisant la méthode d'activité alimentaire.

Il apparaît d'après le tableau V-3, que *Bacillus thuringiensis*, s'est révélé faiblement efficace qualitativement et quantitativement sur tous les isolats fongiques étudiés se traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes (figure V-8).

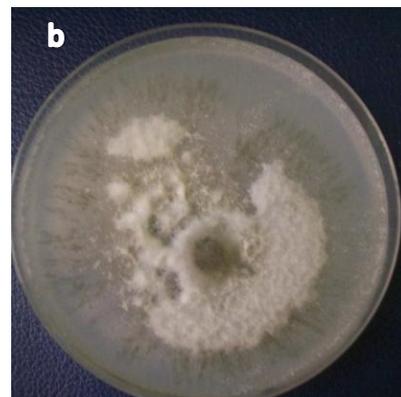
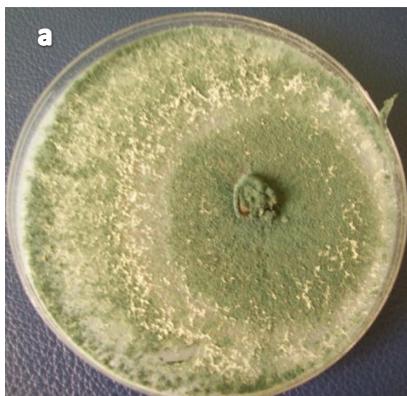
Tableau V-3 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* sur les trois isolats fongiques par dilution dans un milieu gélosé.

		7J			10J		
		D1	D2	TM	D1	D2	TM
A1	d (mm)	41,67	49,67	52	62	71,67	76
	PI%	19,87	4,48	0	18,42	5,70	0
B3	d (mm)	46,67	55	85	78,33	84,33	85
	PI%	45,09	35,29	0	7,85	0,79	0
C2	d (mm)	56,33	62,67	66	77,33	77,33	85
	PI%	14,65	5,05	0	9,02	9,02	0
<i>A1 : Aspergillus fumigatus ; B3 : Aspergillus flavus ; C2 : Penicillium sp</i>							

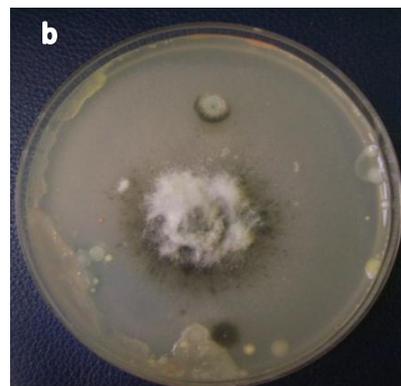
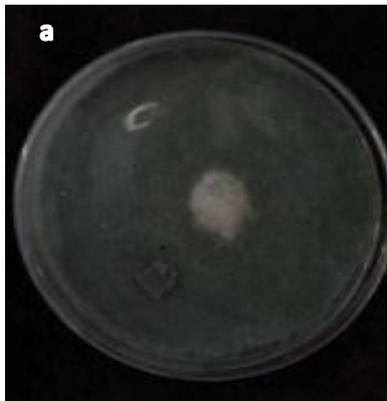
Ce tableau montre que *Bacillus thuringiensis* présente un effet antifongique dont les pourcentages d'inhibition ne dépassent pas les 20% pour tous les isolats fongiques sauf chez le champignon B3 présente une efficacité moyenne dont le pourcentage d'inhibition varie entre 35% et 45% après 7jours.



A1. *Aspergillus fumigatus*



B3. *Aspergillus flavus*



C2. *Penicillium sp*

Figure V-9 : Pouvoir antifongique de *Bacillus thuringiensis* par dilution dans un milieu gélosé représentés par des zones d'inhibition après 7 jours de traitement (Originale 2013)

La lecture après 7 jours : (a) le témoin, (b) le traitement

V .3.1. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur les trois champignons par activité alimentaire

V .3.1.1. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique A1

Le champignon A1 traité avec le biopesticide (à base de *B. thuringiensis*) à différentes dilutions montre une inhibition qui diminue 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 un taux d'inhibition plus au moins important pour la dilution appliquées (D1) avec une évolution respective de 20% après 7 et 10 jours. Tandis que la dilution (D2) a montré un faible pourcentage d'inhibition durant tout le suivi soit (PI= 6%) (Figure V-10).

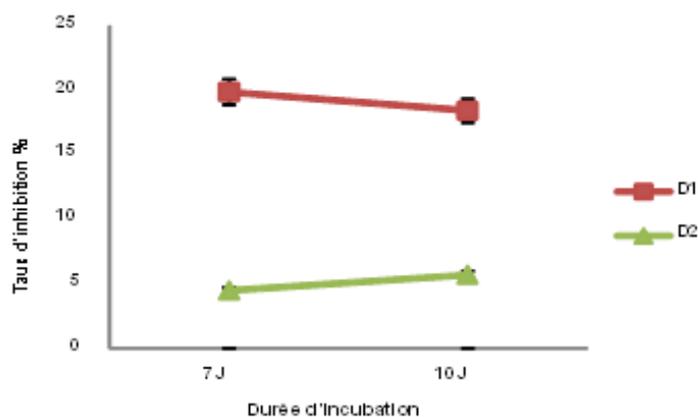


Figure V-10: Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique A1

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

V .3.1.2. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique B3 :

L'application des traitements avec le biopesticide à base de *B.thuringiensis* sur l'isolat fongique B3, montre des effets inhibiteurs de la croissance mycélienne, dans les temps comparés à ceux observés après traitement par le témoin.

Entre les deux observations réalisées (à 7 et 10 jours), une similitude de l'évolution temporelle de la croissance mycélienne est enregistré pour les doses testés (D1 et D2) avec une réduction de celui-ci à 10 jours), avec les valeurs respectives de 7,85% et 0,8% (Figure V-11).

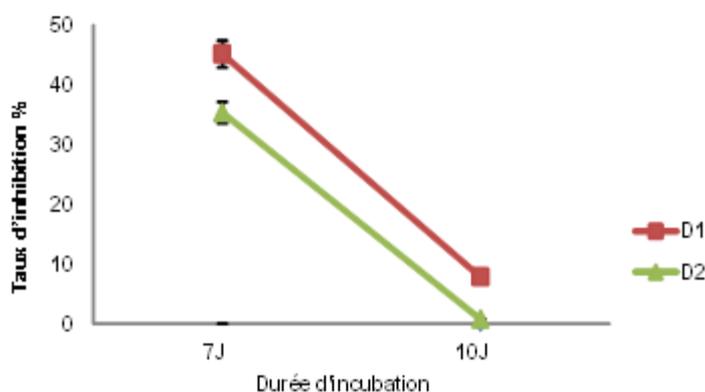


Figure V-11: Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique B3

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

V .3.1.3. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique C2 :

Le traitement de l'isolat C2 par la dilution (D1) de biopesticide (*B.thuringiensis*) indique un important taux inhibition de la croissance mycélienne après 7 jours (PI)=14,65%. Ce taux diminue après 10 jours pour atteindre 9,02%, Mais qui se traduit par un taux relativement faible. Tandis que la dilution (D2) montre une évolution dans le temps mais qui se traduit aussi par des taux d'inhibition relativement faibles avec les valeurs (PI)=5,02% après 7jours et (PI)=9,02% (Figure V-12).

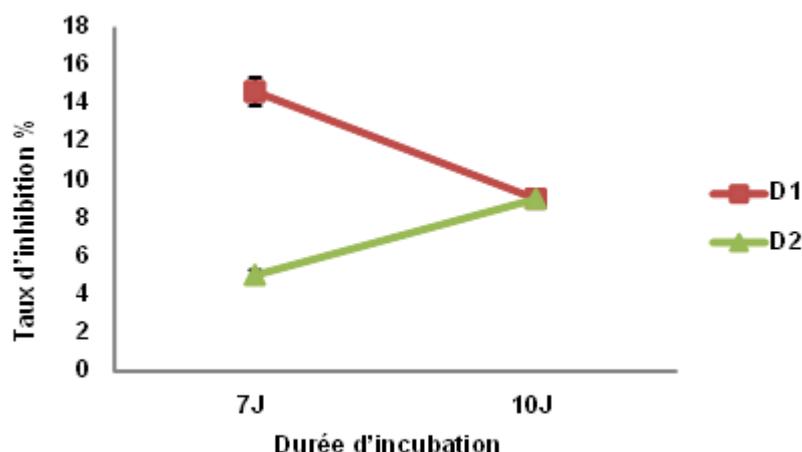


Figure V-12: Evolution temporelle du pouvoir antifongique du biopesticide microbien (*B. thuringiensis*) sur l'isolat fongique C2

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

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 (- 0,8), montre l'existence de trois groupes (Annexe D).

Le premier groupe comprend principalement C2J7, A1J10, A1J7 et qui correspondent aux champignons A1 et C2 après dix jours, Ce groupe est corrélé négativement avec les vecteurs, c'est-à-dire les doses. Il est caractérisé par sa faible activité antifongique représentée par des pourcentages d'inhibition inférieure à 20%.

Le deuxième groupe est représenté par le champignon B3 et C2 après dix jours, il est corrélé négativement avec les doses, ce groupe est défini par les doses à effet antifongique très faible, induisant une inhibition de la croissance mycélienne inférieur à 10%.

Le troisième groupe inclut le champignon B3 après sept jours, il est corrélé positivement avec les vecteurs (doses) car il présente un effet antifongique très élevés par rapport au deux autres groupes, le pourcentage d'inhibition dépasse 45%.

L'analyse multivariée sur l'axe 2 (3,92%) indique que l'effet temporel de la dose D2 se distingue clairement de la dose D1.

L'effet de dose joue un rôle important. Pour la dose D2 enregistre un effet comparable sur les champignons par rapport au D1.

La projection sur le premier axe (96,07%) montre que les doses D1 et D2 montre un effet comparable sur les champignons. (Figure V-13)

La projection des vecteurs à travers le deuxième axe montre que les deux doses D1 et D2 sont corrèlent négativement. (Figure V-13)

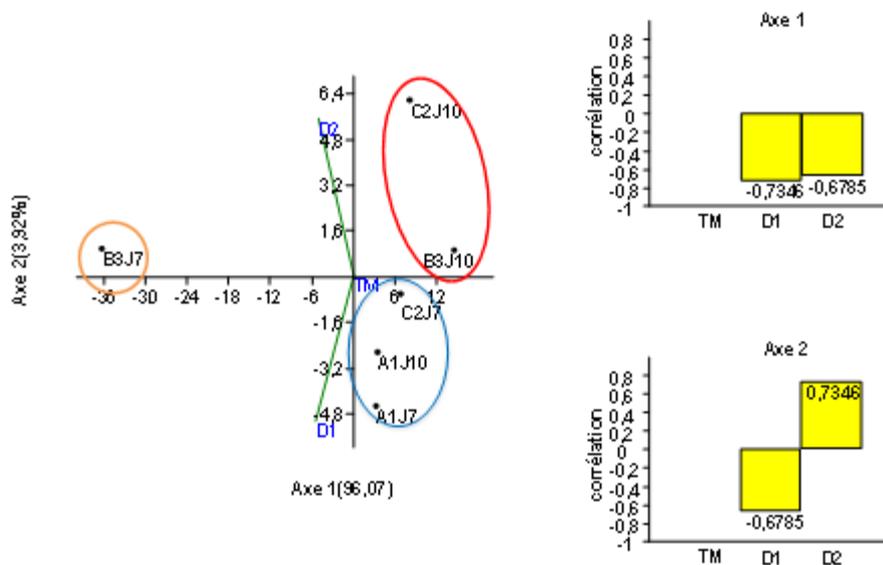


Figure V-13 : Analyse en composantes principales (A.C.P.) du traitement biologique sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques en fonction de la durée d'incubation par dilution dans un milieu gélosé

TM : Témoin ; D1 :1g/l; D2 : 0,5g/l

V .3.2. Effets comparés de l'efficacité du biopesticide microbien (à base de *B. thuringiensis*) sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques

Le modèle général linéaire (G.L.M) a été utilisé afin de déterminer l'effet temporaire de traitement biologique à base de *Bacillus thuringiensis* sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques.

Ce modèle (Tableau V-3, figure V-14), nous a permis de déduire que les effets antifongiques de *Bacillus thuringiensis* sont significatifs selon la concentration du produit ($P=0.002$, $F\text{-ratio}=7.259$; $P<5\%$), la durée d'incubation ($F\text{-ratio}=12.815$, $P=0.001$; $P<5\%$) et les souches fongiques testées ($F\text{-ratio}=3.699$, $P=0.035$; $P<5\%$).

Il ressort aussi de la figure (V-14) que les champignons *A1* et *C2* présentent une résistance importante pour les deux doses vis-à-vis au témoin, se traduisant par un pourcentage d'inhibition inférieur à 10%, contrairement au champignon *B3* présente une sensibilité importante pour les doses se traduisant par un pourcentage d'inhibition supérieur à 15%.

Tableau V-4: Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés

facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	P
Durée	1476.214	1	1476.214	12.815	0.001
Dose	1672.508	2	836.254	7.259	0.002
Pathogène	852.333	2	426.167	3.699	0.035

P>5 %: Probabilité non significative, P<5 %: Probabilité significative ;
P<1% : Probabilité hautement significative.

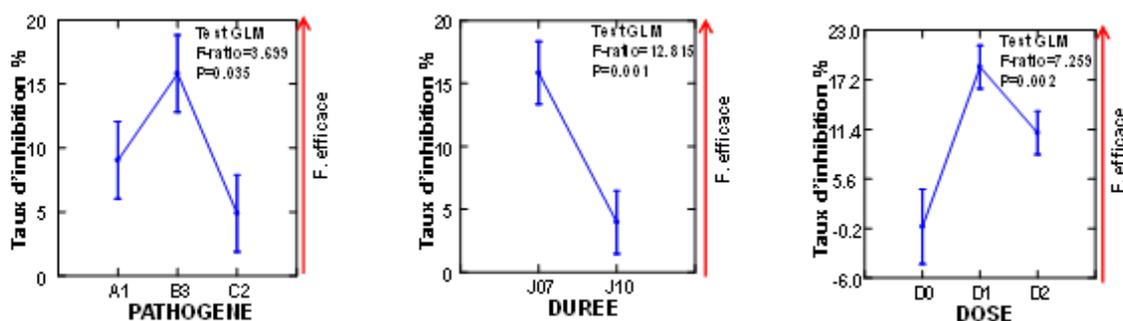


Figure V-14: Effet de *Bacillus thuringiensis* (durée, dose) sur les isolats fongiques par dilution dans un milieu gélosé.

D0 : Eau distillée, D1 :1g/l; D2 : 0,5g/l

Discussion générale

La discussion de nos résultats se base essentiellement sur des conclusions préliminaires et partielles obtenues à partir des principaux isolements fongiques effectués au niveau de laboratoires et sur l'effet fongicide d'un biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis*.

Nos observations macroscopiques et microscopiques réalisées sur milieu PDA ont permis de constater la présence d'une flore fongique assez importante.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montre la présence d'une flore fongique dominée par les espèces du genre *Aspergillus* suivi par le genre *Penicillium*. Comparativement avec les travaux de Belyagoubi (2006), ces genres constituent la flore essentielle du stockage car ils sont tolérés par la plus faible humidité (Godon et Loisel, 1997 et Adebango, 2003). Par conséquent ils sont responsables de la plupart des accidents de conservation d'origine microbiologiques pour les produits considérés (Godon et Loisel, 1997).

La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant des céréales a été enregistrée, ce genre comprend environ 180 espèces, réparties en 18 sections (Gam *et al.*, 1986).

Les formes parfaites (téléomorphes) de certaines d'entre elles sont connues, et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota .

Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc...). Certains d'entre eux sont pathogènes, et/ou produisent des métabolites toxiques pour les mammifères

Les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (Withlow et Hagler, 2001). Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus* identifié dans cette étude, nous soulignons la grande dominance d'*Aspergillus fumigatus* suivi par *Aspergillus flavus*. Cette fréquence de contamination importante est accompagnée aussi par une production de mycotoxines. Si cette présence de flore fongique est surprenante, ce n'est pas la première fois qu'une telle contamination est observée. En effet, des enquêtes

récentes menées en Italie ont démontré la présence de flore productrice de mycotoxine dans les certaines matières premières et aliments (Pietri et *al.*, 2004).

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

L'origine de la contamination des graines des céréales, cas de blé tendre dans notre étude par cette flore fongique est difficile d'être ciblé soit le champ, le transport ou/ et le lieu de stockage ou autres, donc l'origine est mal connu, ce résultat a été également soulevé dans les travaux de Molinié en 2003, en attribuant la cause de la présence de ces champignons aux spores disséminées dans l'air pouvant parvenir de champ ou des poussières présentent dans les silo de stockage.

La présence de ces moisissures dans les lieux de conservation constitue un facteur de détérioration d'origine biologique menaçant la qualité technologique et organoleptique des graines par la sécrétion des mycotoxines.

La dominance des espèces d'*Aspergillus* dans les isolements réalisés nous indique la présence certainement des mycotoxines type aflatoxine.

La stratégie la plus couramment utilisée pour contrôler les maladies fongiques des plantes a été la prévention de la mise en place des champignons phytopathogènes dans la plante hôte, car ces maladies fongiques sont difficiles à contrôler du fait qu'elles sont caractérisées par une infection rapide et un développement explosif des maladies si les conditions de l'environnement sont favorables.

Les interventions phytosanitaires présentent des effets néfastes sur l'environnement et sur la santé humaine à cause de la persistance des résidus de pesticides dans les différents niveaux de l'écosystème, en plus, ils favorisent le développement de souches résistantes aux matières actives utilisées. Il devient par conséquent, indispensable de contrôler biologiquement ces organismes.

Les deux objectifs conjoints ont été menés tout au long de ce travail. Le premier concernait l'isolement de la flore fongique à partir des graines stockées.

Le second, a visé l'évaluation du pouvoir fongicide *in vitro* d'un biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* à l'égard des isolats de champignons phytopathogènes obtenus.

A partir des résultats obtenus dans de cette étude nous pouvons citons les aspects suivants :

L'étude du pouvoir antifongique de biopesticide d'origine microbienne a été évaluée *in vitro* sur trois isolats fongiques à savoir *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Penicillium sp* en utilisant la technique d'activité volatile et dilué dans le milieu gélosé. Les résultats obtenus ont révélé un faible pouvoir fongicide de traitement étudié en fonction ; des isolats testés, des concentrations des doses appliquées et du temps d'exposition.

En effet, la croissance mycélienne du champignon a été inhibée par le biopesticide à base de *B.thuriengisis*. Cependant ce traitement a montré une similarité entre les deux techniques utilisées.

Les résultats obtenus ont été confirmés par une analyse statistique des résultats qui a indiqué que la variation du diamètre des zones d'inhibition dépend de *Bacillus* et du genre des isolats pathogènes qui font l'objet du test.

Ces résultats ont montrés une efficacité faible entre les différentes moisissures avec la biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* et ses différentes concentrations (1g/l, 0,5g/l, 0,25g/l) par les deux modes d'action utilisées.

Dans des essais menés *in vitro* avec *B. thuringiensis*, utilisés sous forme volatile ou dilués dans un milieu gélosé, le champignon C2 était le plus sensible après sept jours, quant à A1 et B3 ils exhibaient une sensibilité intermédiaire.

Les concentrations de *Bacillus thuringiensis* ont montré un pouvoir antifongique sur les isolats étudiés, donnant des résultats en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne qui ne dépasse pas 30%.

Les résultats obtenus par l'activité volatile vis-à-vis *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *penicillium* montrent que les doses utilisés ont un effet antifongique après 7 jours de traitement cet effet diminue après 10jours, les différents isolats arrivent à croitre normalement en présence des trois doses de

Bacillus thuringiensis. Le traitement biologique perd son effet inhibiteur sur la croissance fongique, Cet état nous amène à suggérer deux hypothèses.

La première est relative à la sécrétion des toxines par les isolats étudiés, ces molécules ont annulé l'effet biocide de traitement à 15 jours.

D'après Diener et Davis (1966), la production des aflatoxines est la conséquence de la combinaison de plusieurs facteurs, l'espèce, le substrat et l'environnement.

Munimbazi et Lloyd Bullerman (1998), ont souligné l'influence de 6 isolats de *Bacillus pumilus* sur la production de ses aflatoxines, Botton et Peluso (2003), ont identifiés les composés produits par *B pumilus* qui peuvent inhiber la croissance d'*Aspergillus sp*, les composés actifs qui empêchent la germination des spores d'*Aspergillus* et l'allongement des hyphes.

Les travaux de Edward et Richard (2003), ont relevé que l'activité antifongique de *Bacillus sp* sur *Aspergillus flavus* a demeuré stable pendant 8 jours seulement ce qui concorde avec nos résultats.

Calistru et al., (1997), ont reporté qu'un isolat de *Trichoderma harzianum* et deux isolats de *T. viridae* ont pu inhiber la croissance de *A. flavus*.

Choudhary (1992), a montré que *T. viridae* inhibe la production des aflatoxines B1 à (73.5%) et aflatoxine G1 à 100% si ils sont ensemble cultivé avec *A flavus*.

(Skory et al., 1992 ; Chang et al., 1995) ont noté que L'amélioration de la croissance des plantes pourrait être attribuée aux effets inhibiteurs de *Bacillus spp.* sur les agents pathogènes.

La seconde hypothèse repose sur l'effet toxique des doses appliquées, Le modes utilisé (dilution dans le milieu gélosé) a montré une toxicité presque similaire que le premier mode d'action testé avec les différentes concentrations. La croissance mycélienne de L'isolat B3 est fortement inhibé par les différentes doses, le taux d'inhibition enregistré après une semaine varie entre 8 et 35% .Tandis que les champignons A1 et C2 ont manifesté une faible sensibilité traduite par un pourcentage d'inhibition inférieur à 30% pour toute la gamme de concentrations réalisés

Il existe d'autres modes de bio contrôle à travers l'utilisation des huiles essentielles à l'égard des champignons qui menacent les aliments (Choudhary, 1992).

Montes-Belmon et Carvaial (1998), ont isolé 6 types de plante (Camomille, Basilic, Origan, clou de girofle, thym, piment) qui ont un effet toxique à 100% sur la croissance des *Aspergillus flavus* isolé de maïs stocké.

En effet, Omidbeygi et *al.*, (2007), ont suggéré que les composants des traitements à base d'huile essentielle traversent la paroi en interagissant avec les enzymes et les protéines de la membrane, produisant ainsi un flux de protons vers l'extérieur de la cellule qui provoque des changements, et, finalement leur mort.

Sharma et Tripathi (2006), ont indiqué que les composants des extraits agiraient sur les hyphes du mycélium, provoquant la sortie des composants du cytoplasme, la perte de la rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes, ce qui entraîne sa désintégration et la mort du mycélium, il s'est avéré que le Thym (*Thymus* sp.) riche en groupements phénols a montré une activité inhibitrice particulièrement élevée contre la croissance fongique et la sporulation d'*Aspergillus fumigatus* (Benamarouche, 2010). Ces effets antifongiques semblent avoir une corrélation avec le développement incomplet des conidiophores d'*Aspergillus fumigatus*. Des modifications morphologiques ont été observées et confirmés par les travaux de De billerbeck (2000).

Selon certains auteurs, les champignons ne réagissent pas de la même manière vis-à-vis des biopesticides (Veldhuizen et *al.*, 2006), ce qui pourrait expliquer d'une part la sensibilité des isolats B3 à l'égard de *B. thurigiensis* et le comportement de A1 et C2 affichant une certaine résistance vis-à-vis de ce même biopesticide.

Par comparaison des deux modes d'actions utilisées dans ce travail, nous pouvons conclure que la dilution du biopesticide avec le milieu gélosé et l'activité volatiles ont montré une efficacité antifongique plus au moins intéressante au bout d'une semaine de suivi, Cela suggère que la molécule biologique testée a pu atteindre le site ciblé des isolats à travers la nutrition. Nos conclusions rejoignent celles de plusieurs études qui se sont intéressées du mode d'action des *Bacillus thurengisis*, car les *Bacillus spp* (Gram+) arrivent à se maintenir et à produire des substances inhibitrices vu leur pouvoir de sporulation, la régression de l'efficacité de

B. thuringiensis dans le temps est probablement à cause de la faible persistance de la substance inhibitrice dans le milieu qui peut être attribué à la production des toxines par les isolats étudiés. Le comportement des espèces A1 et C2 affichant une certaine résistance vis-à-vis du biopesticide à base microbienne qui s'est révélé moins efficace au bout de 10 jours. Nos résultats corroborent avec ceux de Tafifet, étudiant des extraits de diverses plantes spontanées montrant que quelques isolats fongiques se sont révélés résistants avec un pourcentage d'inhibition d'environ 20% (Tafifet, 2010).

Les résultats obtenus de cette étude indiquent que toutes les concentrations inhibent la croissance mycélienne au début de traitement. Cette efficacité se traduit par une différence de sensibilité entre les isolats fongiques testés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Par le présent travail, nous avons essayé de contribuer à l'évaluation des potentialités agro-phytosanitaires des microorganismes entomopathogènes pouvant être utilisées localement comme biopesticides dans la gestion de la filière agroalimentaire.

Ainsi, cette étude a montré que les échantillons de blé tendre dans les silos de stockage peut être accompagné par la présence d'une flore fongique, les analyses mycologiques menées ont révélé la présence des genres suivants : *Aspergillus* et *Penicillium*.

Parmi ces isolats trois ont été sélectionné pour l'évaluation de l'effet antifongique d'un biopesticide d'origine microbienne à base de *Bacillus thuringiensis*, par deux modes d'action ; activité volatile et dilution dans le milieu gélosé (PDA) (activité nutritive).

L'étude *in vitro* du pouvoir antifongique de biopesticide d'origine microbienne sur les trois isolats testés à savoir *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus* et *penicillium* s'est révélée intéressante. Leur action inhibitrice s'est montrée efficace sur toutes les souches fongiques.

En effet, la croissance mycélienne du champignon a été inhibée aussi bien par le biopesticide utilisé par activité volatile et/ou dilué dans le milieu gélosé, mais cette dernière a montré une action inhibitrice plus importante que celle de l'activité volatile, présentant un pourcentage d'inhibition élevé.

Les résultats révèlent une sensibilité d'A1 et C2 tandis que B3 et ne se comporte pas de la même manière, une certaine résistance vis-à-vis de ce même biopesticide est relancée la fin du suivi, qui se traduit par l'enregistrement d'un faible pourcentage d'inhibition suite à la reprise de la croissance mycélienne.

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 connus 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 planta* 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 trois isolats fongiques.

Cette étude constitue une première étape dans la recherche de molécules biopesticides d'origine microbienne. Il serait intéressant d'isoler ce genre de bactérie du territoire national afin d'avoir des souches locales et les testées sur ces isolats fongiques et sur autre agents phytopathogènes qui menacent une culture stratégique.

Il serait ainsi envisageable de :

- Cibler les microorganismes à activité fongicide.
- Etablir une collection de souche locale.
- Prévoir des formulations adéquates sur la base de connaissances touchant à la fois les bioagresseurs et le mode d'application.
- Identification moléculaire des souches fongiques isolées du blé tendre pour connaître leur origine et leur toxicité
- Une étude *in vivo* pour obtenir une vue globale sur l'activité antifongique de *Bacillus thuringiensis*
- Réalisation d'une étude toxicologique avant l'application du biopesticide microbien au niveau des silos de stockage.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Adda C., Borgemeister C., Biliwa A. & Meikle W.G., 2002-** Integrated pest management in post-harvest maize: a case study from the Republic of Togo (West Africa). *Agric. Ecosyst. Environ.*, **93**, 305-321.
2. **Adebanjo A. & Bankole S.A., 2003.** Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology* 2(9), 254-263.
3. **Adrian et Rabache M., 1988** - La lysine dans les produits alimentaires. *Industries des céréales*, 34, pp21-24.
4. **Afnor., 1986-** Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2emeEd, Lavoisier TEC & DOC, Paris, pp. 250-263p.
5. **Anonyme., 2004-** Guides des bonnes pratiques hygiéniques, Les éditions des Journaux officiels, Paris, août ;
http://fr.wikipedia.org/wiki/Stockage_des_c%C3%A9r%C3%A9ales.
6. **Anonyme., 2005** - Université Pierre et Marie Curie UFR des sciences de la vie. [Http : //www.museums.org-za/bio/insects home.htm](Http://www.museums.org-za/bio/insects%20home.htm).
7. **Anonyme., 2007-** la lutte 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 sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (afssset). Maisons-Alfort cedex, 115p
8. **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.
9. **Beegle C.C. et Yamamoto T. 1992-** History of *Bacillus thuringiensis* berliner Research and Development. *Canadian Entomologist* 124: 587-616.
10. **Belyagoubi M. L., 2006-** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales ; Université de Tlemcen ; Option : produits naturels : « Activités biologiques et synthèses »
11. **Benamarouche S., 2010** - Pouvoir biopesticide d'une gamme de plantes spontanées à l'égard d'une collection de champignons. Mém. ING. Univ. SAAD DAHLAB de Blida, 145 p.
12. **Benhamou N., 2001-** Les bactéries endophytes : étude de leur potentiel en tant qu'agents inducteurs de résistance locale et systémique chez les plantes

cultivées en serre. Rapport de recherche N°4509. Université Laval Sainte-Foy (Québec).

13. **Bernard J.L. et Bugaret Y., 2002-** La prophylaxie et les méthodes de lutte indirecte en protection des cultures. In : 2e Conférence Internationale sur les Moyens de lutte alternatifs contre les Organismes nuisibles aux végétaux, Lille – 4, 5, 6 et 7 mars 2002, 73-83.
14. **Boiron P., 2005-** Mycologie. Thèse. Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée aux Biotechnologies Industrielles.
15. **Bonnemain J-L. et Chollet J-F., 2003-** Biologie et pathologie végétales. L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. Considérations générales. C. R. Biologies 326 : 1–7.
16. **Botton E.J and Peluso R W., 2003-** Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species :preliminary report. *J. Med. Microbiol.*, 52, 69-74
17. **Boudjemâa H., 1992-** Le défi agro-alimentaire de l'Algérie (Analyse et stratégie pour l'an 2000), OPU, mars. .
18. **Bourgeois C.M., Mescle J.F. & Zucca J., 1996.** Microbiologie Alimentaire. Tome1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Technique & docLavoisier, Paris, pp. 672.
19. **Bouziani M., 2007-** L'usage immodéré des pesticides : de graves conséquences sanitaire-Epidemiologiste, Faculté de médecine d'Oran.
20. **Brust G., D.S. Egel et Maynard E.T., 2003-** Organic vegetable production. Purdue University Cooperative Extension Service, ID-316. p. 1-19.
21. **Bulot S., 1990** - Traitement à la carte pour le grain stocké. Semences et progrès, 63(1990)140-142.
22. **Calistru C., Mclean M. and Berjak P., 1997-** In vitro studies of the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. L . Macroscopical and microscopical observations of fungal interactions, *Mycopathol*, 139, 115-121.
23. **Cangardel H., 1978** - Facteurs favorables au développement des insectes et des acariens des céréales stockées (SCOTTI G), Ed. AFNOR/ITCF- Paris. pp .81-88.

24. **Chadefaud M. et Emberger L., 1960-** Traité de botanique. Systématique. Les végétaux vasculaires par L. Emberger. Fasciculé Masson et Cie. Tome II, 753p.
25. **Chang P K ., Cary J W ., Wright M., Bhatnagar D., Cleveland et al., 1995-** Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *Appl. Environ. Microbiol*, 61, 2365-2371.
26. **Chawla K., 1984.** Management of Cereal Grain in Storage. AGRI – FACTS, Practical Information for Alberta's Agriculture Industry, Agdex.
27. **Cheftel, J.C et Cheftel, H., 1977-** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 105-130.
28. **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.
29. **Choudhary A.K., 1992-** Influence of microbial co-inhabitants on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels, *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 143-147.
30. **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 : 777-780.
31. **Deguine J. P et Ferron P., 2005-** Gestion agroécologique des populations d'insectes piqueurs suceurs en culture cotonnière. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Paris Lavoisier, 2005. p. 367-383.
32. **Djermoun A., 2009-** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques ; 46 *Revue Nature et Technologie*. n° 01/Juin 2009. Département d'Agronomie Université de Hassiba Benbouali de Chlef.
33. **Diener U.L. and Davis.N.D., 1966-** Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*, *Phytopathology*, 56, 1390-1393.
34. **Doumandji A., Doumandji-mitiche B. et Salaheddine, D., 2003.** Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, pp. 1-22.

35. **Druvefors U.Ä., 2004-** Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala*. Doctoral thesis. University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Agraria 44-466.
36. **Du C., Martin P.A.W. & Nickerson K.W. 1994.** Comparaison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3847-3853.
37. **Dunoyer C., 1989-** Principes de la microbiologie en industries céréalière, Industries des céréales, pp. 13-16.
38. **Edward J. Bottone and Richard W. Peluso., 2003-** Production by *Bacillus pulmilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus species* : preliminary report, *J. Med. Microbiol.*, 52, 69-74 .
39. **Feillet P., 2000.** Le grain de blé composition et utilisation. Ed. INRA, Paris, 308.
40. **Gavira Terrones Fr. et Burny Ph., 2012.** Evolution du marché mondiale du blé au cours des cinquantes dernières années ; Livre Blanc « Céréales » Ulg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W Gembloux. (Source des données de base : USDA, FAO)
41. **Godon B. et Loisel W., 1997-** Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. 2eme Ed, Tech & Doc Lavoisier, Paris, pp. 819.
42. **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.
43. **Godon B. & Loisel W., 1997-** Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. 2eme Ed, Tech & Doc Lavoisier, Paris, pp. 819.
44. **Griffitts et Aroian 2005-** Many roads to resistance : how invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays* 27, pp : 614-624
45. **Guiraud J.P., 1998-** Microbiologie alimentaire Ed. Dunod 648p
46. **Hammer O., Harper D.A.T., et Ryan P. D., 2001-** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
47. **Harlan., 1966-**Distribution of Wild wheat and barley. *Science*.New york, 153, pp1074-1080.

- 48. 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.
- 49. Josette C., 1995-** Utilisation de biopesticides contre les ravageurs des cultures : le point sur *Bacillus thuringiensis* ; n°97-1995(2).
- 50. Jouany J. P. & Yiannikouris A., 2002-** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales* 15 (1), 3-16.
- 51. Kellou R., 2008 -** Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréales français dans le cadre du pôle de compétitivité Quasi-Méditerranée. Le cas des coopératives Sud céréales, Groupe coopératif Occitan et Audecoop-Montpellier. (Master of science, IAMM, 2008, Série Thèses et Masters n°93). 168p.
- 52. Ketoh G.K., Koumaglo H.K. & Glitho I.A., 2005-** Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Stored Prod. Res.*, **41**, 363-371.
- 53. Kossou D et Ahon., 1993-** Stockage et conservation des grains alimentaire tropicaux. Ed. Flomboyant, Benin.125P.
- 54. Kouassi M., 2001-** Les possibilités de la lutte microbiologique, emphase sur le champignon entomopathogenes *B. Bassiana*. *Vertigo - La revue en sciences de l'environnement sur le WEB*, Vol 2 (N°2), Oct. 2001. http://www.vertigo.uqam.ca/vol2no2/art3vol2n2/mathias_de_kouassi.html
- 55. Larpent J. P., 1990-** Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2^e édition. Masson, Paris. 512 pages.
- 56. Leroux P., 2004-** Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. In : *Botrytis : Biology, Pathology and control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195-222.
- 57. Lord J.C., 2005-** From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 19-29.

58. **Magan N. et Lacey J., 1988-** Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology Elsevier* 7(3), 245-256.
59. **Magan, N. , Hope C.V. et Aldred, D., 2003-** Post – harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109, 723-730.
60. **Miller J.D. & Trenholm H.L., 1994-** Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxins. Eagan Press, St Paul MN.
61. **Mills J.T., 1990-** Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 68, 982-986.
62. **Molinié, A. et Pfohl-Leszkowicz, A. 2003-** Les mycotoxines dans les céréales : les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire- Auzeville- Tolosane. Note de l'ASEDISSO N°spécial Mycotoxines (2003), 9 pages.
63. **Molinié A., Faucet V., Castegnaro M. & Pfohl-leszkowicz A., 2005-** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry* 92, 391-400.
64. **Moll M. & Moll N., 1995-** Sécurité Alimentaire du consommateur. Chapitre 3 : les mycotoxines : des contaminants omniprésents dans l'alimentation humaine et animale, risque et prevention, pp. 300.
65. **Montes-Belmon R. and M. carvaial., 1998-** Control of *Aspergillus flavus* in maize plant essential oils and their components, *J. Food Prot*, 61, 616-619.
66. **Moule C., 1972-** Phytotechnie spéciale :Céréales. Ed .FIRMIN-DIDOT, Paris, MESNIL-IVRY, N°415, Tome II, 235p 29.
67. **Multon J.L., 1982-** Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Dérivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, pp. 576.
68. **Munimbazi C. and Lloyd Bullerman B., 1998-** Inhibition of alfatoxine production of *aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*, *Mycopathol.*, 163-169

69. **Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z., 2007-** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18, pp: 1518-1523.
70. **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.
71. **Panneton B., Vincent C., Fleurat-lessard F., 2000-** Place de la lutte physique en phytoprotection, pp. 1-24 in C. Vincent, B. Panneton et F. 127 Fleurat-Lessard (Eds.) *La lutte physique en phytoprotection*, INRA Editions, Paris, 347 p.
72. **Panon M.L., Panigai L., Walker A.S. & Leroux P., 2006-** Les nouveautés concernant la pourriture grise : en quelques points. *Le Vigneron Champenois* 127 : 26-36.
73. **Perry J.J. ; Staly J.T et Lory S., 2004-** Microbiologie : cours et questions de révision. Ed : DUNOD, Paris, 891p.
74. **Pezet R., Viret O. & Gindro K., 2004-** Plant-microbe interaction : the botrytis grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In : *Advances in Plant Physiology* (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7 : 71- 116.
75. **Pfohl-leszkowicz A., 1999-** Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris, pp. 478.
76. **Philippeau G., 1986-** Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. I.T.C.F., Paris, 63 pp.
77. **Prats H., 1960 -** Vers une classification des graminées. *Revue d'Agrostologie Bull. Soc Bot. France*: 32-79.
78. **Rampersad J., Khan A. and Ammons D. 2003.** A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. *Current Microbiology* 47: 355-357.
79. **Sache I., 2003-** L'épidémiologie. *In* *Phytopathologie* (eds. Lepoivre p.) pp. 193-213. DeBoeck & Larcier, Bruxelles.
80. **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

81. **Sharma N. et 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.
82. **Simon H., Codaccioni P., Lequeur X., 1989-** Produire des céréales à paille. Coll. Agriculture d'aujourd'hui. Science, Techniques, Applications. pp. 63 - 67; pp. 292 - 296.
83. **Sims S.R., 1995-** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* CryIA(c) protein expressed in transgenic cotton: Effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist* 20: 493-500.
84. **Skory C.D, Chang P.K. and Cinz J.E., 1992-** Isolation and characterization of agence from *aspergillus parasiticus* associated with the convesion of versicolorin A to sterrigmatocystin in alfatoxin biosythesis, *Appl. Environ. Microbiol* , 58, 3527-3537.
85. **Tantaoui, E.A., 1977.** Production d'aflatoxine par des *Aspergillus* du Maroc. *Homme. Terre et Eaux* 6(24), 79- 86.
86. **Tafifet L., 2010 -** Effet bactéricide fongicide et nématocide in vitro de quatre espèces végétales spontanées. Mém. de Magister, Spécialité : Protection des plantes et environnement. Univ. SAAD DAHLAB de Blida, 164 p.
87. **Thakore Y., 2006-** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3) :294-208.
88. **Veldhuizen, E.J., J.L. Tjeerdsma-Van bokhoven, C. Zweijtzer, S.A. Burt AND H.P. Haagsman., 2006-** Structural requirements for the Antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, pp: 1874-1879.
89. **Watkinson I., 1994-** Global view of present and future markets for Bt products. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 3-7.
90. **Withlow L.W. & Hagler W.M., 2001-** Mycotoxin contamination of feedstuffs- An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Québec.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I. Présentation du blé tendre	
I.1.Importance du blé	4
I.1.1.Dans le monde.....	4
I.1.2. En Algérie	5
I.2. Origine et historique du blé.....	5
I.3.Variétés de blé tendre cultivées en Algérie.....	6
I.4. Structure et Composition biochimique du blé tendre.....	7
I.5. Systématique du blé tendre.....	8
I.6.Stockageet conservation du blé.....	8
I.6.1. Le stockage traditionnel du blé.....	9
I.6.2. Autres méthodes de stockage peu fréquent actuellement.....	9
I.7. Facteurs d'altération du blé tendre.....	9
I.7.1. Altérations chimiques ou biochimiques.....	9
I.7.2. Altération d'origine mécanique ou physique.....	1
	0
I.7.3. Les altérations dues aux moisissures.....	1
	0
I.7.4. Altération d'origine biologique.....	1
	0
Chapitre II. Présentation des moisissures	
II.1.Les microorganismes.....	1
	2
II.1.1. Moisissures des céréales.....	1
	3
II.1.2. Effets néfastes des moisissures.....	1
	4
II.2. Mycotoxines et écotoxigénèse.....	1
	4
II. 2.1. Mycotoxines	1
	4

II. 2.1.1. Les aflatoxines	1
	6
II. 2.1.2. Les époxytrichothécènes.....	1
	6
II. 2.1.3. La zéaralénone.....	1
	6
II. 2.1.4. Les ochratoxines.....	1
	7
II. 2.1.5. La citrinine.....	1
	7
II. 2.1.6. La patuline.....	1
	7
II. 2.1.7. La stérigmatocystine.....	1
	7
II. 2.2. Ecotoxigénèse.....	1
	8
II.3. Méthodologies de lutte contre les champignons phytopathogènes.....	1
	8
II.3.1. La lutte chimique.....	1
	8
II.3.2. La lutte génétique.....	1
	9
II.3.3. Lutte physique et mécanique.....	1
	9
II.3.4. La lutte préventive.....	1
	9
II.3.5. La lutte biologique.....	2
	0
II.3.5.1. Les biopesticides.....	2
	0
Chapitre III. Présentation du biopesticide d'origine microbienne	
III. Cas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
	2

III.1. Systématique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
	3
III.2. Description et caractéristique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
	3
III.3. Cycle biologique du <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
	5
III.4. Les toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i> (BT).....	2
	7
III.4.1. Mode d'action du <i>Bacillus thuringiensis</i> et cibles cellulaires des δ - endotoxines	2
	7
III.5.Utilisation de <i>Bacillus thuringiensis</i> et de ses dérivés en tant que biopesticide.....	2
	8
III.6. Impact des toxines <i>Bacillus thuringiensis</i> sur l'environnement	2
	9

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre IV. Matériel et méthodes

IV .1. Objectifs	3
	0
IV .2. Matériels d'étude	3
	0
IV .2. 1. Matériel végétale	3
	0
IV. 2. 2. Matériel microbiologique.....	3
	1
IV .3. Isolement et recherche de la microflore su stockage	3
	1
IV.3.1.Désinfection et isolement	3
	1
IV.3.2. Observation et purification des cultures	3

	2
IV.4. Préparation des dilutions a testés.....	3
	3
IV.4.1. Préparations des suspensions	3
	3
IV.4.2. Préparation des dilutions de <i>B. thurengisis</i> dans le milieu gélosé.....	3
	3
IV .5. Application des traitements biologiques	3
IV.5.1. Etude du pouvoir antifongique in vitro du <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
IV.5.2.Lecture des résultats.....	3
IV .6. Analyse statistique des résultats.....	3
	3
	4
	3
	5
Chapitre V. Résultats et discussion	
V. 1. Recherche des flores fongiques du stockage.....	3
	6
V. 1.1. Caractères morphologiques des champignons isolés.....	3
	6
V. 2. Évaluation de l'activité fongicide du biopesticide d'origine microbienne (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur les trois isolats fongiques A1, B3, C2.....	3
	8
V .2.1. Étude de l'efficacité fongicide du biopesticide d'origine microbienne (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur les isolats fongiques par l'activité volatile	3
	8
V .2.2. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur les trois isolats fongiques	4
	0
V .2.2.1.Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique A1	4
	0
V .2.2.2. Tendence globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B.</i>	

<i>thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique B3.....	4
	0
V .2.2.3. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (<i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique C2	4
	1
V .2.3. Effets comparés de l'efficacité du biopesticide microbien à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur les isolats fongiques	4
	3
V .3. Étude de l'efficacité fongicide du biopesticide d'origine microbienne à base de <i>B. thuringiensis</i> sur les trois isolats fongiques par activité alimentaire	4
	5
V .3.1. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur les trois champignons par activité alimentaire	4
	7
V .3.1.1. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique A1.....	4
	7
V .3.1.2. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique B3.....	4
	8
V .3.1.3. Tendance globale d'effet du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur l'isolat fongique C2	4
	9
V .3.2. Effets comparés de l'efficacité du biopesticide microbien (à base de <i>B. thuringiensis</i>) sur le taux d'inhibition des trois isolats fongiques.....	5
	1
Conclusion et perspectives.....	5
	9
Références bibliographiques	
Annexes	

ANNEXES

Annexe A

Composition du milieu de culture utilisé

(Pour un litre de milieu)

- Milieu de culture à base de pomme de terre " Milieu PDA" (Potato Dextrose Agar)

Les ingrédients :

- Pomme de terre 200g
- D. glucose 20g
- Agar 20g
- Eau distillée 1000ml

Ajuster le PH a 7 avant d'ajouter l'agar.

Autoclavage 30 minutes à 120°C.

Annexe B

➤ **Matériel de laboratoire**

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

Annexe C

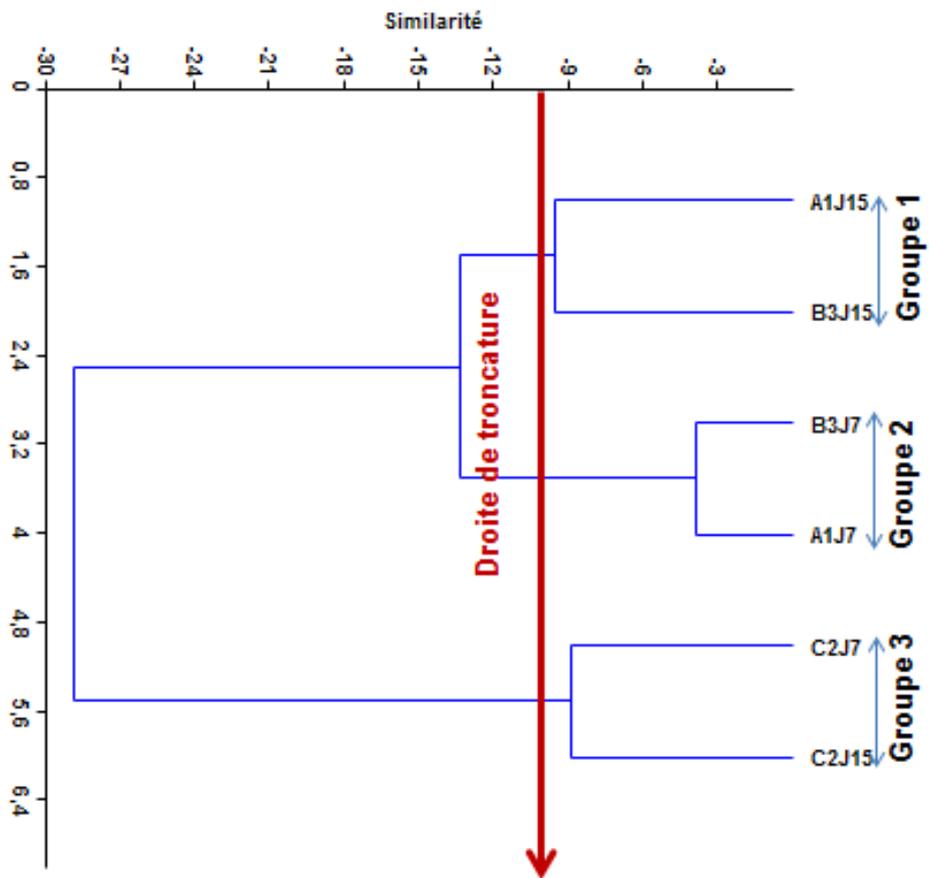


Figure : Classification hiérarchique ascendante (C.H.A.) sur les trois isolats fongiques par activité volatile

Annexe D

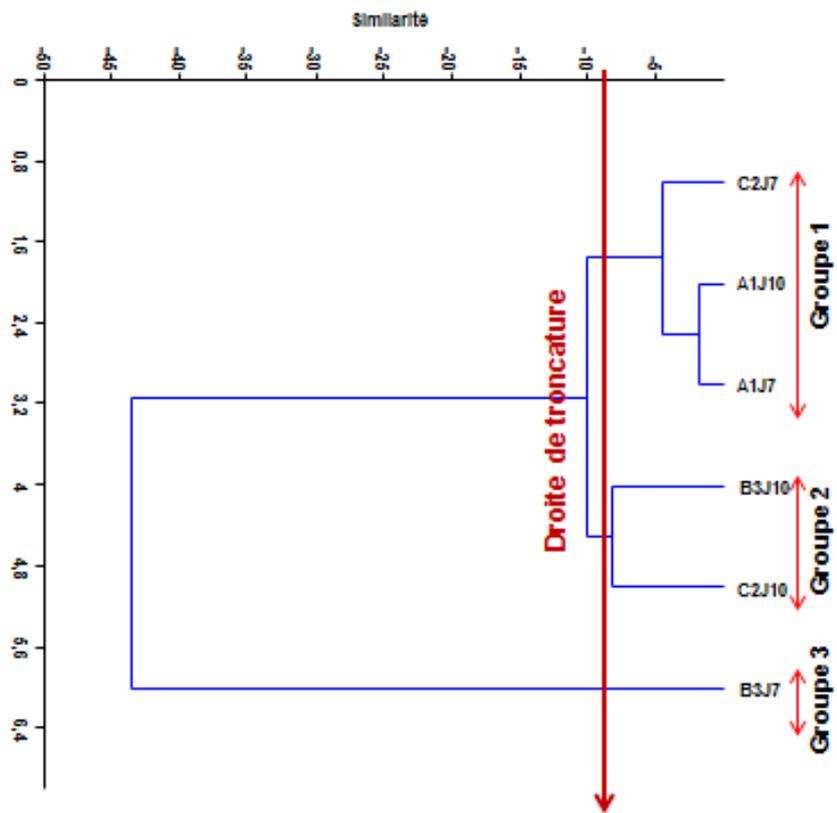


Figure : Classification hiérarchique ascendant (C.H.A.) sur les trois isolats fongiques par dilution dans un milieu gélosé

