

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE UNIVERSITAIRE SALHI AHMED -NAAMA



Institut des Sciences et Technologies
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de
Master Académique en Sciences Biologiques
Spécialité « Microbiologie Appliquée »

Thème

*« Caractérisation du cortège floristique du biofilm des silos de
stockage des céréales-Cas de la minoterie Merabet – ».*

Présenté par :

Melle Harkati Saâdia

Soutenu le 09-10-2020 devant le jury :

<i>Mr . GHERIB Mohamed</i>	Maitre de conférences A	Président
<i>Mr . AMROUCHE Abdel-ilah</i>	Professeur	Encadreur
<i>Mme. LAGHA Nouria</i>	Maitre de conférences A	Examinatrice

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciements:

Je remercie tout d'abord le bon DIEU de m'avoir donné la patience et le courage pour bien mener ce travail.

*Je tiens tout d'abords à manifester toute ma gratitude à mon directeur de thèse **Pf. Amrouche Abdelilah** pour ses qualités humaines et sa gentillesse.*

Merci d'avoir accepté de m'encadrer, de m'avoir proposé le thème de la recherche et surtout pour votre disponibilité.

*J'exprime également toute ma reconnaissance à **Mr. GHERIB MOHAMED** et je le remercie de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*Je voudrais ensuite remercier : **Mme LAGHA NOURJA** membre de mon jury, pour avoir accepté avec joie d'évaluer ce travail en dépit de ses nombreuses autres obligations.*

Merci pour le regard critique sur ce travail.

*Je voudrais ainsi remercier vivement les ingénieurs de laboratoire de **CUN***

*Je voudrais ainsi remercier vivement **Mr MERABET, Mr MESSMOUDI** et **Mlle ALLAOUI Zyneb** ainsi que tout le personnel de la minoterie, pour avoir mis à mon disposition les moyens nécessaires pour le bon déroulement de mon travail et de me faciliter l'accès libre à unité.*

Dédicace:

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant La gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

Je dédie ce travail :

- ❖ Celle pour laquelle je dois tout et je ne rendrais jamais assez, Ma très chère Mère ; merci tu es toujours la source de joie, d'espoir et d'amour.*
- ❖ Celui qui représente pour moi l'exemple du courage, de volonté, Mon très cher Père.*
- ❖ Mes frères **Walid, Youcef et Zakaria.***
- ❖ Spécialement à mes tantes **Sadika et Merabha.***
- ❖ Ma chère grand-mère .*
- ❖ Tous mes adorable amies, Sans particularité.*
- ❖ Toute la promotion de **BIOLIGIE 2020.***
- ❖ Toutes les personnes qui m'ont soutenues et crus en moi lors de mon parcours et à tous ceux qui m'ont aidés de près ou de loin.*

Saâdia

المخلص:

على المستوى العالمي تعتبر الحبوب كمصدر رئيسي لتغذية الانسان وكذلك الحيوان. إلا ان تواجد الفطريات في الحبوب و خصوصا الموجهة للاستهلاك البشري يشكل خطرا كبيرا على صحة المستهلك. كما ان نمو هذه الكائنات الفطرية أحد الأسباب الرئيسية لتدهور صحة الحبوب ، من بين هذه الحبوب القمح. عادة ما يكون فقدان حبات القمح نتيجة تدهورها بسبب التلوث الفطري الذي يمكن أن يحدث أثناء التخزين. تشمل هذه الفطريات أنواعا مثل تلك التي تنتمي إلى أجناس الاسبارجيليس والبنسيليوم التي يمكن أن تنتج السموم الفطرية الضارة بالحيوانات والبشر. يمكن التعرف على هذه الفطريات باستخدام مجموعة من الخصائص الدقيقة والثقافية والجزئية. في هذا العمل ، نستشهد بطريقتين مستخدمتين في علم الفطريات لتحديد الفطريات من خلال التسلسل ، وهما الترميز الشريطي للحمض النووي باستخدام منطقة ITS وتصنيف الحمض النووي باستخدام جين واحد أو أكثر في محاذاة التسلسل واستخدام أدوات بناء الشجرة لتقدير العلاقات النشوء والتطور..

الكلمات المفتاحية: القمح - الفطريات - الخصائص الجزئية.

Abstract :

Cereals have always been the main nutritional resource of man and animal in the world. The presence of fungal flora in cereals intended for human consumption can have serious health consequences. The development of this flora is one of the main causes of damage to the health of cereals, including wheat. Grain loss in wheat is generally the result of spoilage due to fungal contamination that may occur during storage. These fungi include species such as those belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* which can produce mycotoxins harmful to animals and humans. Identification of these fungi can be performed using a combination of micromorphological, cultural and molecular factors. In this work, we cite two methods used in mycology for the identification of fungi by sequences, Namely, DNA barcoding using ITS region and DNA taxonomy using one or more genes in sequence alignments and using tree building tools to estimate phylogenetic relationships.

Keywords: wheat - fungi - molecular characteristics.

Résumé :

Dans le monde, les céréales constituent depuis toujours la principale ressource nutritionnelle de l'homme et de l'animal. La présence de flore fongique dans les céréales destinées à l'alimentation de l'homme peut engendrer de graves conséquences sur sa santé. Le développement de cette flore compte parmi les principales causes d'altération sanitaire des céréales, parmi ces céréales le blé. La perte de grains du blé est généralement le résultat de sa détérioration due à la contamination fongique qui peut se produire lors de stockage. Ces champignons comprennent des espèces telles que celles appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui peuvent produire des mycotoxines nocives pour les animaux et les humains. Dans la mesure du possible, l'identification des champignons doit être effectuée en utilisant une combinaison de facteurs micromorphologiques, culturels et les caractères moléculaires. Dans ce travail, nous citons deux méthodes utilisées dans mycologie pour l'identification des champignons par séquences, à savoir, Codage à barres de l'ADN en utilisant la région ITS et la taxonomie de l'ADN en utilisant un ou plusieurs gènes dans des alignements de séquences et l'utilisation d'outils de construction d'arbres pour estimer les relations phylogénétiques.

Mots clés : blé – champignons – caractères moléculaires.

Liste des abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique.

ARNr : acide ribonucléique ribosomique.

a_w : activité de l'eau (Activity Water).

CBS : Central bureau voor Schimmel cultures.

CCLS : Coopératives de Céréales et Légumes Secs.

CMPG : Collection de Mycologie de Pharmacie de Grenoble.

CTAB : bromure d'hexadécyltriméthylammonium.

CYA : Czapek Yeast Extract Agar.

dNTP : deoxyribonucleotide triphosphate.

EPS : Extracellular Polymeric Substances.

G25N : Les géloses 25 au nitrate de glycérol.

GCPSR : Genealogical concordance phylogenetic species recognition / concept de reconnaissance d'espèce phylogénétique par concordance généalogique.

IAA : industrie agro-alimentaire.

IMI : International Mycological Institute.

ITS : Internal Transcribed Spacer.

LSUnr : large subunit of the nuclear ribosomal.

MEA : l'extrait de malt Agar.

MUCL : Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve.

OAIC : Office Algérien Interprofessionnel des Céréales.

PCR : polymerisation chaine reaction / réaction en chaine par polymérase.

pH : potentiel hydrogène.

SSUnr : small subunit of the nuclear ribosomal.

UPGMA : unweighted pair group method with arithmetic mean.

UV : ultra-violet.

XDLVO : Extended Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek.

Liste des tableaux :

Tableau I.2. Classification du blé..... **4**

Tableau I.4.3. Distribution histologique des principaux constituants du grain du blé..... **7**

Liste des figures :

Figure I.4.3. Coupe d'un grain de blé.....	6
Figure I.1.3.1. Schéma d'une tête aspergillaire.....	15
Figure I.1.3.2. Schéma d'un <i>Penicillium</i>	16
Figure I.1.3.3. Schéma d' <i>Alternaria</i>	17
Figure I.1.3.4. Schéma d'un Fusarium (a) Microconidie; (b) Chlamidospores	17
Figure I.1.3.5. Appareil reproducteur des mucorales	18
Figure III. Méthodes d'identification morphologiques et moléculaires des champignons.....	30

Sommaire :

Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux	ii
Liste des figures	iii
Introduction générale	1
Partie I :	
Chapitre 1 :	
I.Le blé	3
I.1.Taxonomie de blé	3
I.2.Classification botanique	4
I.3.Caractéristiques des blés dur et tendre.....	4
I.3.1.Blé dur.....	4
I.3.2.Blé tendre.....	4
I.4.Composition histologique et biochimique du grain	5
I.4.1.Enveloppes	5
I.4.2.Germe	5
I.4.3.Albumen	5
I.5.Activités vitales des grains	7
I.5.1.Respiration.....	7
I.5.2.Fermentation	8
I.5.3.Germination.....	8
I.6.Altérations de blé.....	8
I.6.1.Altérations enzymatiques	8
I.6.2.Altération d'origine mécanique ou physique.....	8
I.6.3.Altération d'origine biologique.....	9
I.7.Stockage et conservation du blé.....	9
I.7.1.Les différentes méthodes de stockage du blé.....	10
I.7.1.1.Stockage traditionnel.....	10
I.7.1.2.Stockage en silos	10
I.7.1.3.Stockage en gerbe.....	10
I.7.1.4.Stockage en épis.....	10

Chapitre 2

I-Les moisissures pathogènes du blé	11
I-1- Caractères généraux.....	11
II.1.2-Conditions de croissance	12
II.1.2.1. Facteurs de développement.....	12
II.1.2.2.Interactions.....	14
II.1.2.3.Proportion de grains brisés dans un lot	14
II.1.2.4.Arthropodes	15
1-3-Moisissures d'altération du blé.....	15
1-3-1-Genre <i>Aspergillus</i>	15
1-3-2- Genre <i>Penicillium</i>	16
1-3-3-Genre <i>Alternaria</i>	16
1-3-4-Genre <i>Fusarium</i>	17
1-3-5-Les <i>Mucorales</i>	18
1-5-Role des moisissures	18
1-5-1-Action bénéfique des moisissures	19
a- Intérêt alimentaire.....	19
b- Intérêt chimique.....	19
c- Intérêt pharmaceutique.....	20
d- Intérêt médical.....	20
1-5-2-Action néfaste des moisissures	20
a- Modifications visuelles du blé.....	20
b- Modifications biochimiques du blé.....	21
c- Production des mycotoxines dans le blé.....	22

Chapitre 3 :

I. Biofilm.....	25
I.1. Les définitions.....	25
I.2. Etapes de formation de biofilm.....	26
I.2.1.Adhésion réversible	26
I.2.2.Adhésion irréversible.....	26
I.2.3.Formation de micro-colonies	27
I.2.4.Maturation du biofilm	27

I.2.5.Dispersion du biofilm	27
I.3.Facteurs influençant la formation de biofilm	28
I.3.1.Caractéristiques de la surface	28
I.3.2.Caractéristiques du milieu	28
Partie II :	
Partie pratique :	
I.1.Objectif de l'étude	29
II.1.Carde de l'étude.....	29
II.2.Echantillonnage	29
II.3. Préparation des milieux de culture	29
II.4. Dénombrement de la flore fongique.....	30
II.5. Purification des isolats	30
II.6.Identification des champignons	31
II.6.1.Identification des genres	31
II.6.1.1.Observation macroscopique.....	31
II.6.1.2.Observation microscopique	31
III. Identification des champignons à l'aide d'outils moléculaires.....	32
III.1.Les trois gènes ribosomiques nucléaires les plus communément utilisé pour l'identification des champignons.....	33
III.2.Méthodes utilisées dans la construction de l'arbre phylogénétique à partir de séquences d'ADN	34
III.2.1.Probabilité maximale	36
III.2.2.Inférence bayésienne	36
IV. Matériels et méthodes.....	36
IV.1.Les isolats.....	36
IV.2.Conditions de culture	37
IV.3.Extractions d'ADN, amplifications PCR et séquençage	37
IV.4. Restriction des digestions enzymatiques	37
IV.5.Analyse des profils de restriction	38
V.Résultats	38
Conclusion	40

Références bibliographiques	41
Annexes	



INTRODUCTION GENERALE

Les grains de céréales constituent, depuis toujours, la principale ressource alimentaire de l'homme et de l'animal et possèdent un pouvoir nutritionnel important. Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage (**Pfohl-Leszkowicz et al., 1999**). Le blé fait partie des trois grandes céréales avec le maïs et le riz. C'est la troisième espèce par importance de la récolte mondiale, et la plus consommée par l'homme. En Algérie, le blé est cultivé pour son grain, c'est une culture qui occupe grandes surfaces. On distingue deux espèces de blé: le blé tendre et le blé dur. Ces deux espèces, se différencient par la friabilité de l'amande. L'amande du blé tendre est blanche et friable, tandis que celle du blé dur est jaune et plus dure. Au moulin, les graines de blé tendre sont broyées en farine, celles-ci servent à la fabrication de pains, de biscuits, de pâtisseries, de pizzas, de viennoiseries. A la semoulerie, les grains de blé dur sont broyés en semoules, ceux-ci servent à la fabrication de pâtes et de couscous (**Nedjah, 2015**). 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 et al., 1999**). Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et, parfois parasites. Constituent un agent de détérioration très important. Elles sont omniprésentes dans la nature et possèdent un arsenal enzymatique très varié, ce qui leur permet de croître sur divers substrats. Les champignons sont morphologiquement, écologiquement, métaboliquement différents, et phylogénétiquement différents. Ils sont connus pour produire de nombreuses molécules bioactives, ce qui les rend très utiles pour les chercheurs en produits naturels dans leur recherche la découverte d'une nouvelle diversité chimique avec l'agriculture, l'industrie, et les applications pharmaceutiques. D'autre part, les moisissures diminuent la qualité technologique (taux du gluten) et sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et animales) réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économiques dus aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés (**Gacem, 2011**). La contamination fongique provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives) (**Filtenborg et al., 1996**). Par ailleurs, dans des conditions propices de température, humidité, pH, composition de substrat,

les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines. Parmi la centaine de mycotoxines identifiées à l'heure actuelle, une trentaine sont véritablement importantes pour la santé humaine et animale à cause de leur fréquence ou de leur toxicité (**Bennett & Klich., 2003**). Les toxines majeures sont produites par des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (**Afssa, 2006**).



Partie I



Chapitre I

Le blé

I. Le blé :

Le blé est l'une des principales céréales. Cette plante herbacée annuelle qui produit le grain dont on tire la farine pour faire notamment le pain et les pâtes alimentaires constitue la base de la ressources alimentaires de l'humanité. En effet, La production mondiale de blé en 2008 a été de 686.8 millions de tonnes (CIC, 2000). La production mondiale de blé en 2012, est de 690 millions de tonnes. En Algérie, la superficie réservée à la céréaliculture est, aujourd'hui, de 3,3 millions d'hectares qui représentent 90% des terres cultivées. Si on se réfère aux chiffres de 1929, on constate que cette superficie n'a pas évolué. 40% de cette surface sont destinés à la production du blé dur. Ces rendements, restent très bas puisqu'ils ne tournent qu'autour de 10 à 15Qx/ha, malgré les efforts fournis pour répondre aux besoins alimentaires de la population qui est toujours croissante. Cette faible production est souvent expliquée par l'influence des mauvaises conditions pédoclimatiques associées, notamment à : la désertification, l'érosion, la pollution, les mauvaises pratiques agricoles et la salinisation des sols (Selmi, 2000).

I.1. Taxonomie de blé :

L'appellation blé regroupe de nombreuses espèces qui appartiennent, selon la classification hiérarchique des espèces, aux angiospermes (plantes à fleurs) monocotylédones de la famille des Poaceae (poacées en français, anciennement graminées), de la sous-famille des Poadeae et de la tribu des *Triticeae* (Mathieu, 2010)

I.2. Classification botanique :

Le blé peut être classé comme suite (tableau I) :

Tableau I.2. Classification du blé (Doumandji et *al.*, 2003).

Classification	Blé
Règne	Plantae (Règne végétale)
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Liliopsida (Monocotylédones)
S / classe	Commelinidae
Ordre	Poale
Famille	<i>Poaceae</i> (ex : Graminées)
S / famille	<i>Triticeae</i>
Tribu	<i>Triticeae</i> (Triticées)
S / tribu	<i>Triticineae</i>
Genre	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum aestivum</i> L. ou <i>Triticum vulgare</i>

I.3. Caractéristiques des blés dur et tendre :

I.3.1. Blé dur :

Le blé dur est une catégorie de blé cultivée dans les pays de climat chaud et sec. Les grains de blé dur sont allongés, souvent même pointus, les enveloppes sont assez minces et légèrement translucides. Ils donnent moins de son que les blés tendres et la farine obtenue, bien que contenant plus de gluten (12 à 14 %), se prêtent moins bien à la panification (Ben chibane, 2013).

I.3.2. Blé tendre :

Les grains de blé tendre sont arrondis, les enveloppes sont épaisses, sans transparence. Ils se prêtent particulièrement bien à la mouture ; en effet, lors du passage entre les cylindres, les enveloppes s'aplatissent et s'ouvrent sans se broyer, libérant l'amande et donnant une très forte

proportion de son. Les blés tendres permettent d'obtenir une farine de bonne qualité, contenant environ 8 à 10 % de gluten, ayant de bonnes aptitudes pour la panification (**Ben chiban, 2013**).

I.4. Composition histologique et biochimique du grain :

Le grain de blé est constitué de 3 grandes parties : le germe, l'albumen et les enveloppes. (Figure 1). Il est constitué majoritairement d'amidon qui représente environ 70% de la matière sèche du grain et qui est situé dans l'albumen. Les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus du grain de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (**Pomeranz et al., 1988**). Les pentosanes (polysaccharides non amylicés) représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80%)(**Clément, 2010**).

I.4.1. Les enveloppes et la couche à aleurone :

Les enveloppes sont constituées de quatre tissus : le péricarpe externe, le péricarpe interne, la testa et la couche nucellaire ou bande hyaline (qui correspond à l'épiderme du nucelle). Ces enveloppes et la couche à aleurone sont composées principalement de polysaccharides (arabinoxylanes, xyloglucanes et cellulose) mais aussi d'acides phénoliques, lignine et de protéines (principalement albumines globulines localisées dans la couche à aleurone) (**Clément, 2010**).

I.4.2. Germe :

Le germe provient de la fusion des gamètes mâles et femelles. Il est constitué d'une part, de l'axe embryonnaire qui donnera la tigelle, le mésocotyle et la radicule et d'autre part du scutellum qui donnera le cotylédon (**Evers et al., 2002**). Le germe est la partie du grain où le taux d'humidité et la concentration en lipides sont les plus importantes (**Pomeranz et al., 1988**). Les protéines dans le germe sont des albumines et globulines et représentent environ 35% de la matière sèche (**Clément, 2010**).

I.4.3. Albumen :

L'albumen constitue le plus important compartiment du grain et représente environ 80% de son poids (**Pomeranz et al., 1988**). Il correspond au tissu de réserve. L'albumen amylicé est essentiellement constitué des granules d'amidon enchâssés dans une matrice protéique composée en grande partie de prolamines (gliadines, gluténines de hauts et faibles poids moléculaires) mais aussi d'albumines et de globulines. Ces deux familles protéiques,

gluténines et gliadines, sont hydrolysées lors de la germination et du développement de la plantule par les enzymes produites dans l'embryon et la couche à aleurone. Elles constituent la source d'acides aminés nécessaires à la germination de la graine. Les cellules de l'albumen amylicé possèdent des parois fines et peuvent être classées en trois grands groupes (Evers et al., 2002) :

- Les cellules périphériques situées sous la couche à aleurone et mesurant 60µm.
- Les cellules prismatiques situées sous les cellules périphériques qui mesurent entre 128-200µm de long et 40-60µm de large.
- Les cellules situées dans la partie centrale de l'albumen qui sont de forme arrondie ou polygonale mesurant entre 72-144µm de long et 69-120µm de large.

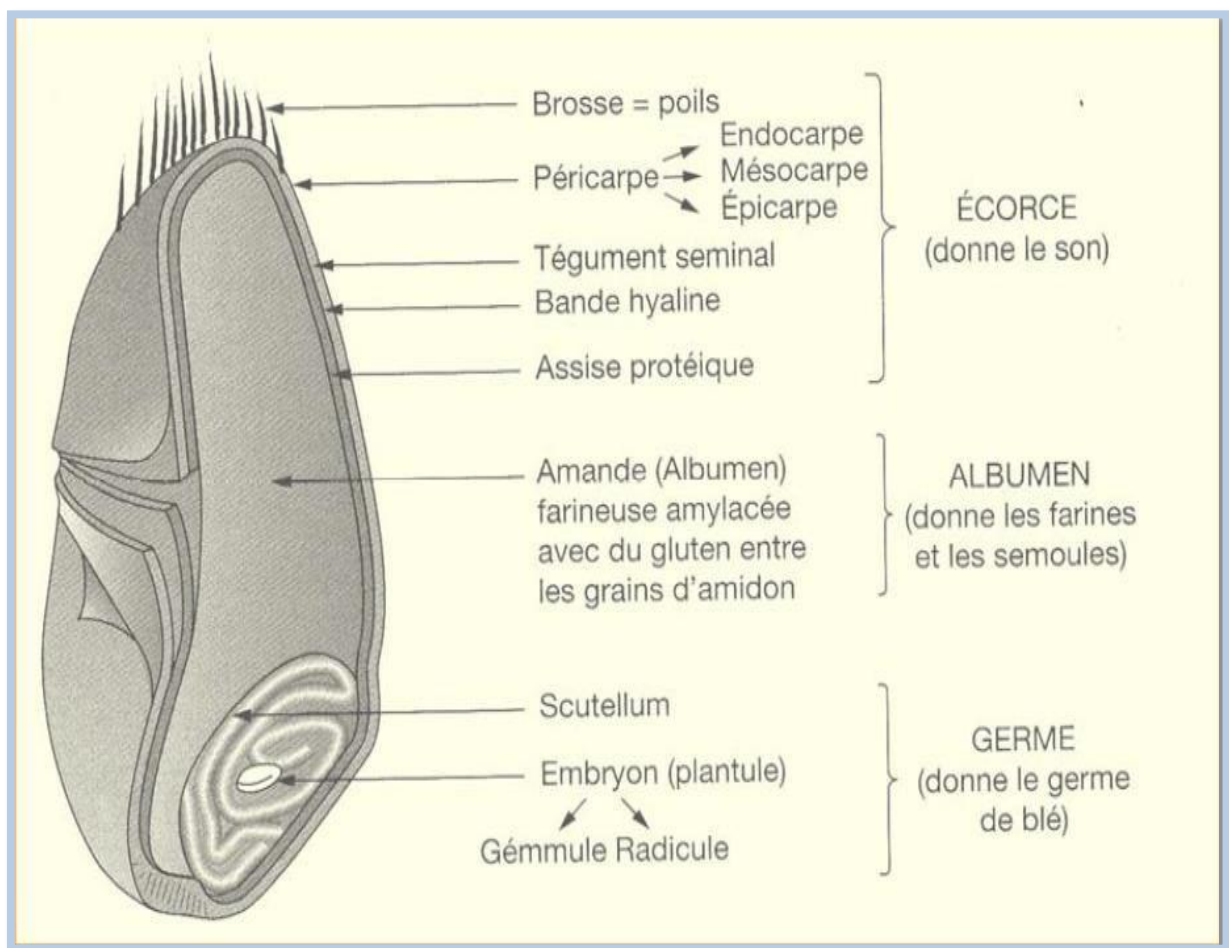


Figure I.4.3. Coupe d'un grain de blé (Fredot, 2009)

Tableau I.4.3. Distribution histologique des principaux constituants du grain du blé d'après. (Feillet, 2000)

Constituants(% de masse du grain)	Protéines (%)	Matière Minérales (%)	Lipides (%)	Matière Cellulosique (%)	Pentosanes (%)	Amidon (%)
Péricarpe (4%)	7 - 8	3 - 5	1	25 - 30	35 -43	0
Téguments (1%)	15 - 20	10 - 15	3 - 5	30 - 35	25 - 30	0
Reste du nucelle	30 - 35	6 - 15	7 - 8	6	30 - 35	10
Assise protéique	30 - 35	6 - 15	7 - 8	6	30 - 35	10
Germe	35 - 40	5 - 6	15	1	20	20
Albumen (82 - 85 %)		8 - 13	0.35 - 0.6	1	0.5 - 3	70 - 85

Activités vitales des grains :

Les grains sont des organismes vivants qui, même en vie ralentie, sont le siège de réactions des métabolismes. Par ailleurs, les grains sont toujours associés à des microorganismes (spores de moisissures) présents sur leur surface et l'on parle alors du complexe grains-microorganismes. Si les grains sont placés dans des conditions ambiantes particulièrement chaudes et humides comme celles des régions tropicales, ils vont accroître leur activité biologique en consommant l'énergie emmagasinée dans leur réserves sous forme d'amidon (Jean-François, 2016).

I.4.4. Respiration :

Le grain est un organisme vivant qui respire entraînant ainsi un dégagement de gaz carbonique, d'eau et de chaleur (Meghazi, 2015). Avec ses réactions d'oxydation, la respiration a toujours lieu quelles que soient les conditions de stockage, que les grains aient ou non leur faculté germinative intacte. L'intensité du phénomène est fonction de la

température et de l'humidité du grain ainsi que la quantité d'oxygène présente dans la cellule de stockage (Berhaut et al., 2003). La chaleur dégagée par cette respiration va accélérer les autres manifestations vitales du grain comme la respiration anaérobie et, notamment, la germination (Meghazi, 2015). Elle peut être assimilée à la dégradation d'un glucide simple et schématisée comme suit :



Amidon + oxygène → eau + gaz carbonique + chaleur

I.4.5. Fermentation :

En l'absence d'oxygène (anaérobiose), il peut y avoir un processus de fermentation, le plus souvent alcoolique, caractérisé par la production de gaz carbonique, d'alcool et un léger dégagement de chaleur. (Jean-François, 2016)



Amidon → alcool + gaz carbonique + chaleur

I.4.6. Germination :

La germination est l'aboutissement naturel de l'activité vitale des grains. Elle est déclenchée en présence d'oxygène et dans des conditions optimales d'humidité et de température. La qualité des grains commence à s'altérer (dégradation de l'amidon, perte de matière sèche, etc.) dès que la germination est initiée. La germination ne doit donc pas débiter pendant les périodes d'entreposage et de conservation. (Ventilation et conservation des grains à la ferme. (Berhaut et al., 2003).

I.5. Altérations de blé :

I.5.1. Altérations enzymatiques :

Elles sont essentiellement provoquées par les enzymes propres du grain. En mauvaises conditions de stockage, ces derniers entrent en activité et favorisent la dégradation de l'amidon et le rancissement des lipides (Berhaut et al., 2003).

I.5.2. Altération d'origine mécanique ou physique :

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

rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (Meghazi, 2015).

I.5.3. Altération d'origine biologique :

Un lot de grains entreposé comporte inévitablement au moins deux entités vivantes : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux). La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique. 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 (Gacem, 2018).

I.6. Stockage et conservation du blé :

Le stockage et la bonne conservation ont pour but de préserver au maximum les qualités originelles des grains. Ainsi, la constitution de stocks a proprement révolutionné l'organisation de la société en assurant une alimentation régulière tout au long de l'année. (Meghazi, 2015). Autrement dit, le but des technologies de conservation est de préserver par des moyens appropriés l'intégrité des principales qualités des graines qui ne peuvent pas être améliorées pendant le stockage (Chawla et al., 1984). En Algérie, la collecte des céréales, dont le blé, est assurée par deux types d'opérateurs : public, il s'agit de l'Office Algérien interprofessionnel des céréales OAIC ou privés (négociants ou transformateurs). Ces agents remplissent un rôle hautement stratégique, car de leur efficacité va dépendre la constitution de stocks et donc la sécurité alimentaire nationale (Rastoin et al., 2014). La capacité de stockage de l'OAIC est de 28 millions de quintaux dont 18.5 millions de silos portuaires et continentaux. Cette capacité est considérée comme insuffisante et un programme de développement a été lancé en Janvier 2013 prévoyant la construction de 39 silos d'une capacité totale de 8.2 millions de quintaux. L'OAIC contrôle environ 80% du marché algérien des céréales. Il dispose d'un vaste et puissant réseau pour assurer la collecte, le stockage et la distribution de céréales et légumes secs. Pour remplir ses missions, l'office s'appuie sur un réseau très dense comprenant 41 Coopératives de Céréales et Légumes Secs (CCLS) qui assurent la quasi-totalité de la collecte de la récolte nationale, à travers 600 points. (Meghazi, 2015).

I.6.1. Différentes méthodes de stockage du blé :

I.6.1.1. Stockage traditionnel :

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

I.6.1.2. Stockage en silos :

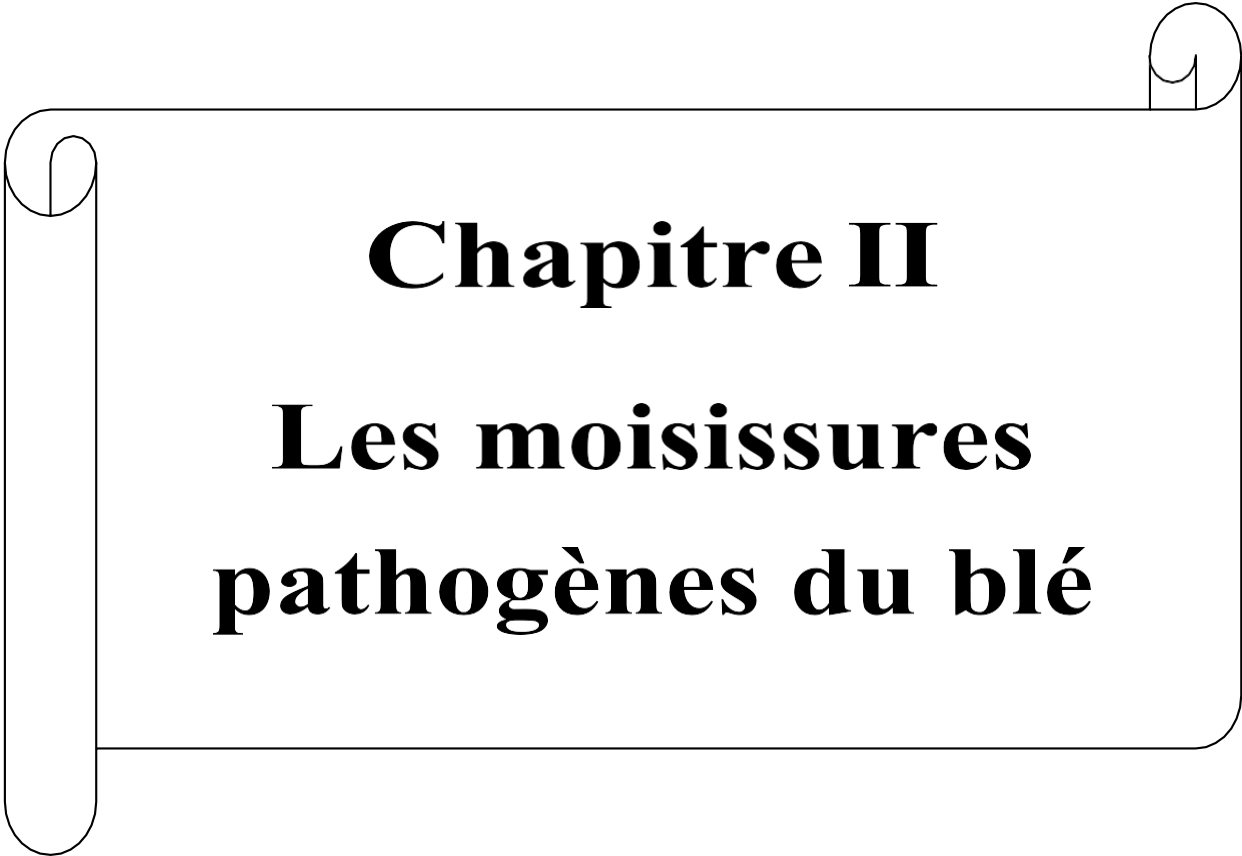
les silos permettent de stocker plusieurs types de céréales en même temps: ils sont multi-produits (Duron, 1999). Ce sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal. Elles sont fermés à leur partie supérieure par un plancher sur lequel sont installés les appareils de remplissage des cellules. L'emploi des silos réduit la main d'oeuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux. Il existe plusieurs types de silos: silos de ferme (500 à 10 000 quintaux), silos coopératifs (10 000 à 100 000 quintaux) et silos portuaires (50 000 quintaux) (Doumandji et al., 2003). Il existe aussi des silos de capacité de 175.000 à 250.000 tonnes. Toute livraison peut être suivie en temps réel et les relevés de poids délivrés peuvent être édités automatiquement (Duron, 1999).

I.6.1.3. Stockage en gerbe :

Ce type de premier c'est qu'il permet de répartir le battage sur tout l'hiver, le second est de permettre une bonne conservation sans séchage artificiel des grains relativement stockage est mieux encore que celui en épis car le grain est protégé contre l'échauffement et les insectes notamment les charançons, mais les gerbes exigent davantage de travail à la récolte et au transport. Il a deux principaux avantages, le humides (Multon et al., 1982).

I.6.1.4. Stockage en épis :

Le stockage en épis est une technique très répandue pour toutes sortes de céréales dans le monde. Il demande bien moins de volume que le stockage en gerbes, d'où un coût moindre en bâtiments et par conséquent le contrôle de l'ambiance du stockage est plus facile. (Belyagoubi, 2015).

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both featuring rounded ends and a small scroll-like detail at the corners.

Chapitre II
Les moisissures
pathogènes du blé

I. Les moisissures pathogènes du blé :

Le nombre d'espèces fongiques varie de 60 à 100 milles (**Reboux et al., 2010**). Elles sont omniprésentes dans notre environnement. La plupart sont phytopathogènes et se développent en saprophyte dans la terre et sur les plantes ou les débris végétaux en voie de putréfaction, elles se retrouvent aussi bien dans l'air que sur le sol et les surfaces, dans l'alimentation et parfois dans l'eau (**Meghazi, 2015**). Elles se rencontrent également sur les viandes et les produits d'origine animale, les cadavres d'animaux et les déjections des animaux herbivores (**Delarras et al., 2007**).

Les moisissures saprophytes contaminent les aliments et les dégradent de point de vue qualitatif (**Guiraud, 1998**). Les espèces pouvant contaminer les aliments sont très nombreuses, se retrouvent aussi bien sous forme végétative (conidies) que sous leur forme sexuée (ascospores), ces dernières étant particulièrement aptes à la survie (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**).

En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (**Multon et al., 1982**).

I.1. Caractères généraux :

Le terme « moisissure », bien qu'il ne soit en aucun cas une dénomination de taxonomistes, il est communément utilisé pour désigner tout micro-organisme fongique saprophyte appartenant aussi bien aux champignons supérieurs (Ascomycètes, Hyphomycètes, Basidiomycètes) qu'aux champignons inférieurs à hyphes coenocytiques (Zygomycètes) (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**). Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (**Nicklin et al., 2000**). Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'oeil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée. (**Bourgeois et al., 1989**). Les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou

des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition. (mallek, 2017).

Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) (Nicklin et al., 2000) et mésophiles (température optimale 20-30°C) (Botton et al., 1990). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ($T < 15^{\circ}\text{C}$ ou même parfois $< 0^{\circ}\text{C}$, comme *Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*). Elles ont, en générale, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($a_w = 0.65$) (Boiron, 1996). Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes) (Touati, 2016).

Les moisissures saprophytes contaminent les aliments et les dégradent de point de vue qualitatif (Guiraud et al., 1998). Les espèces pouvant contaminer les aliments sont très nombreuses, se retrouvent aussi bien sous forme végétative (conidies) que sous leur forme sexuée (ascospores), ces dernières étant particulièrement aptes à la survie (Chapeland-Leclerc et al., 2005).

En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon et al., 1982).

I.2. Conditions de croissance :

I.2.1. Facteurs de développement :

Les moisissures ont un métabolisme actif en rapport avec leur mode de nutrition par absorption (Moreau et al., 1996). Leurs développements sont dépendants de la nature des substrats disponibles (cellulose, lignine, etc...) et les conditions physiques : températures, activité de l'eau (a_w) ou disponibilité en eau, pH et oxygène (Gibson et al., 1994). Aussi, Gock 2003 signalent que la température, l'activité de l'eau et le pH contrôlent largement la germination et la croissance des moisissures xérophiles. Les conditions de développement de chaque espèce est spécifique en terme de condition physicochimique (Reboux et al., 2006).

I.2.1.1. Température :

Elle joue un rôle prépondérant sur la croissance mycélienne. D'une manière générale, les moisissures peuvent se développer sous des températures allant de moins zéro à plus de 50°C (**Proctor et al., 1995**). La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (**Bourgeois et al., 1989**) Les moisissures les plus courantes sont mésophiles, elles se développent entre 15°C et 30°C dont l'optimum se situe entre 20°C et 25°C. Cependant certaines espèces sont psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (**Davet et al., 1996**) D'autres souches peuvent se développer à des températures très hautes (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**). Ces dernières sont appelées les thermophiles extrêmes capables de se développer au dessus de 45°C (*Aspergillus*, *Cladosporium*) (**Guiraud et al., 1998**).

I.2.1.2. Humidité :

Au lieu du taux d'humidité, l'activité de l'eau (a_w) d'une substance est utilisée pour exprimer les besoins du champignon. Plus l' a_w est faible, moins il y'aura d'eau disponible pour la croissance du champignon (**Cahagnier et al., 1998**). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (**Bourgeois et al., 1989**). Elle conditionne également leurs activités lipolytiques et protéolytiques (**Butt et al., 2004**). Celles qui colonisent les milieux solides comme les grains de céréales en cours de stockage ou encore les produits céréaliers séchés sont qualifiées de xérophiles (aimant les milieux secs), (**Cahagnier et al., 1998**). Les activités d'eau nécessaires à leur croissance vont de 0.68 à 0.83 (**Reboux et al., 2006**). En outre, l'interaction entre la température et la teneur en eau du grain influe sur l'importance de la colonisation de ces moisissures, car le passage de l'eau du grain à l'état de vapeur est favorisé par une augmentation de la température (**Proctor et al., 1995**).

I.2.1.3. pH :

Il dépend de la concentration en proton d'un milieu, il a une grande incidence sur son équilibre ionique. (Guiraud et al., 1998). La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (Botton et al., 1999), Cependant, le développement maximum de moisissures sur les céréales s'opère entre les pH allant de 6 à 8 (Reboux et al., 2006). Ce dernier a une incidence sur le potentiel de croissance des moisissures xérophiles (Gock et al., 2003).

I.2.1.4. La composition gazeuse (oxygénation) :

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois et al., 1989).

Selon (Procto et al., 1995), leur développement dépend aussi des proportions d'oxygènes, d'azote et d'oxyde de carbone dans l'atmosphère interstitiel. La sporulation des moisissures est sous la dépendance de facteurs nutritifs en particulier le rapport C/N et d'environnement (Guiraud et al., 1998).

I.2.2. Interactions :

Les interactions sont possibles entre plusieurs espèces de moisissures. Le plus souvent, c'est une succession de moisissures qui assurera la dégradation progressive du substrat, et selon les cas, il peut y avoir alliance ou antagonisme (Moreau et al., 1996).

I.2.3. Proportion de grains brisés dans un lot :

Ces derniers ont été endommagés au cours de la récolte, de la manutention, du battage ou du séchage (Gwimer et al., 1996).

I.2.4. Arthropodes :

Les arthropodes tels que les insectes, les acariens et leurs interactions complexes, contribuent à la prolifération des moisissures et ce par leur rôle de vecteurs de spores. Les moisissures servent de source alimentaire pour les arthropodes et parfois agissent comme des agents pathogènes (Proctor et al., 1995).

I.3. Moisissures d'altération du blé :

I.3.1. Le genre *Aspergillus* :

Dans le blé stocké, les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet et al., 2000). Les *Aspergillus* sont des contaminants très communs, ce genre comprend de 180 à 250 espèces selon les auteurs dont seules *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, et *A. niger* sont considérées comme thermotolérantes (Reboux et al., 2010). Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans le grain de blé stocké sont surtout : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* (Mathew et al., 2011). Si le blé est stocké à une teneur d'humidité de 14 à 15% et à une température d'environ 70°C, il sera lentement envahi par d'autres espèces notamment *Aspergillus restrictus*. Cette dernière représente l'espèce qui prédomine dans le blé stocké pendant quelques mois si l'humidité est inférieure à 15%. Au dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que : *Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus ruber* prédominant et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (Magan et al., 2003).

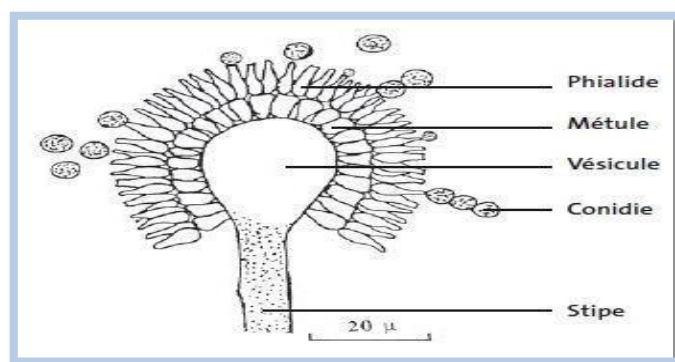


Figure I.3.1. Schéma d'une tête aspergillaire (Meghazi, 2015).

I.3.2. Genre *Penicillium* :

De tous les champignons, c'est probablement le genre *Penicillium* qui est le plus ubiquitaire. (Reboux et al., 2010). Les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (Boudreau et al., 1992). Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt et al., 1988). Les espèces les plus communes sont essentiellement : *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium hordei*, *Penicillium freii*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium crustosum* (Dijksterhuis et al., 2007).

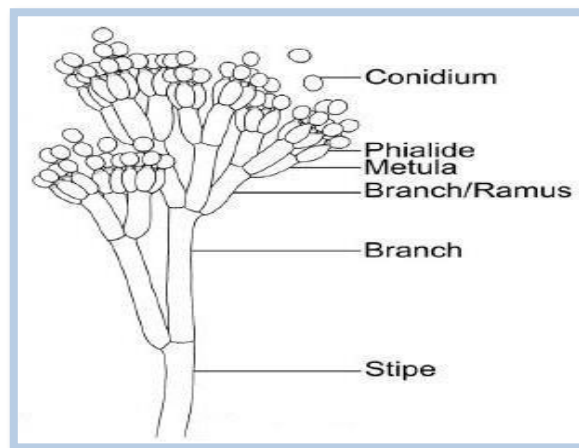


Figure I.3.2. Schéma d'un *Penicillium* (Visagie et al., 2014).

I.3.3. Genre *Alternaria* :

Le genre *Alternaria* regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (Simmons et al., 1993). Il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides (Dendy et al., 2000). Les espèces les plus fréquentes sont : *Alternaria alternata* est connue par la production des mycotoxines (Andersen et al., 2002) et *Alternaria infectoria* cause la décoloration et la dévalorisation du grain mais elle est non toxino-génique (Webley et al., 1997).

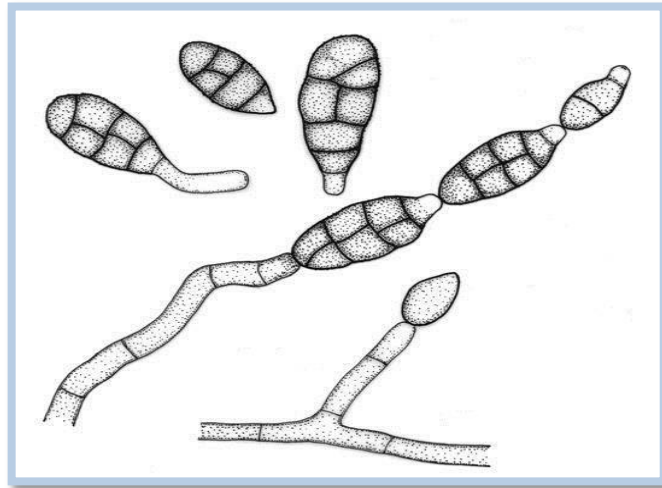


Figure I.3.3. Schéma d' *Alternaria* (Sharma et al., 2014).

I.3.4. Genre *Fusarium* :

Il comprend les espèces qui ont à la fois des pouvoirs pathogènes et saprophytes. Les espèces rencontrées sont surtout : *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* (Van der Burgt et al., 2009). La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines . (Tabuc et al., 2007). Les deux espèces *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* peuvent causer la pourriture de la tige et la brûlure de l'épi du blé et ces infections de champ peuvent conduire à l'altération post récolte plus importante de ce produit s'il est stocké à une trop forte activité de l'eau (Adams et al., 2008).

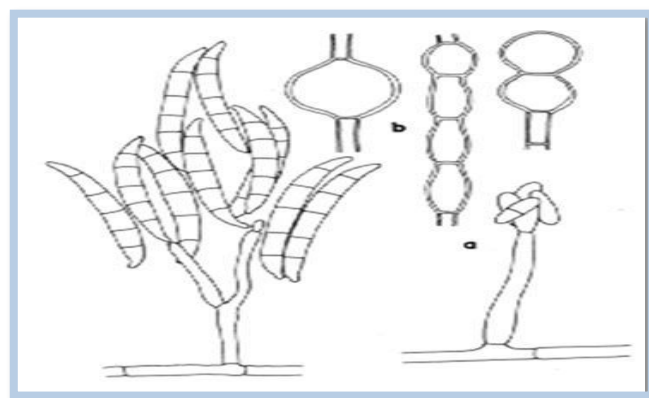


Figure I.3.4. Schéma d'un *Fusarium* (a) Microconidie; (b) Chlamidospores (Meghazi, 2015).

I.3.5. Les Mucorales :

Cette sous famille regroupant les genres *Absidia sp*, *Mucor sp*, *Rhizomucor sp* et (Reboux et al., 2010). Les mucorales sont des champignons cosmopolites très répandus, saprophytes du sol où ils se nourrissent à partir de végétaux, ils contaminent fréquemment les denrées alimentaires comme les céréales, les fruits et légumes, certaines espèces sont pathogènes de plantes (Chabasse et al., 2002).

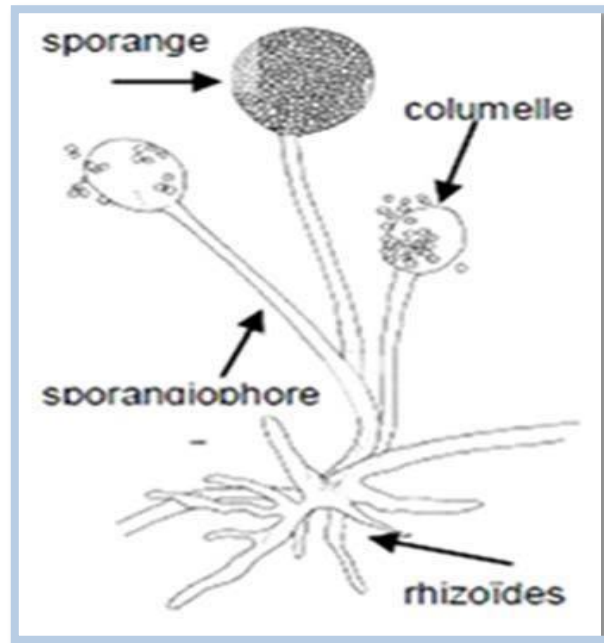


Figure I.3.5. Appareil reproducteur des mucorales (Dufresne et al., 2013).

I.4. Role des moisissures :

Les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron et al., 1996). Sur le plan économique on peut distinguer deux groupes de moisissures, celles qui sont utiles, utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques (Boudra et al., 2009). Aussi, leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud et al., 1992).

I.4.1. Intérêt alimentaire :

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, protéolytiques) qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des agents technologiques utilisés dans l'affinage des fromages et dans la production d'enzymes (**Guiraud et al., 1998**). Selon **Webster et al (2009)**, les *Aspergillus* et les *Penicillium* jouent un rôle primordial en biotechnologie grâce à leur aptitude à produire de grandes quantités d'enzymes extracellulaires tels que les protéases, amylases, lipases et pectinases utilisés dans de nombreux processus industriels y compris la fabrication de produits de boulangerie, les produits laitiers, les jus et dans l'industrie de l'amidon. Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (**Leveau et al., 1993**). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (**Botton et al., 1999**). La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger*, de *Fusarium graminearum* et de *Trichoderma harzianum* (**Botton et al., 1999**)

II.1.4.2. Intérêt chimique :

La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (**Delgado-Jarana et al., 2002**). Certains genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Mucor* et *Penicillium* sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique (**Botton et al., 1999**). En biolixiviation seules les bactéries présentent un intérêt industriel. Cependant, certaines moisissures possèdent d'intéressantes propriétés ; *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum* et *Rhizopus arrhizus* sont capables d'absorber de l'uranium du minerai. Les milieux de culture carencés en facteurs de croissance et en sels minéraux, diminuent le taux de croissance, mais stimulent ce phénomène (**Boiron et al., 1996**). En biolixiviation seules les bactéries présentent un intérêt industriel. Cependant, certaines moisissures possèdent d'intéressantes propriétés ; *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum* et *Rhizopus arrhizus* sont capables d'absorber de l'uranium du minerai. Les milieux de culture carencés en facteurs de croissance et en sels

minéraux, diminuent le taux de croissance, mais stimulent ce phénomène (**Boiron et al., 1996**).

I.4.3. Intérêt pharmaceutique :

Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (**Botton et al., 1999**). Cependant les acides organiques d'origine fongique n'ont pas une application pharmaceutique importante (**Divies et al., 1984**). Selon (**Boiron et al., 1996**), les toxines secrétées par quelques moisissures s'accompagnent également d'un pouvoir antibactérien qui s'exprime préférentiellement sur des espèces du genre *Bacillus*. La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eremothecium ashbyii* cultivé en milieu agité et supplémenté en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (**Botton et al., 1999**).

I.4.4. Intérêt médical :

La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (**Botton et al., 1999**). Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (**Boiron et al., 1996**).

I.5. Action néfaste des moisissures :

I.5.1. Modifications visuelles du blé :

I.5.1.1. Germination :

Selon **Heredia 2009**, la diminution de la germination se produit lorsque les champignons de stockage envahissent le germe ou l'embryon du grain. Ce dernier affaibli et meurt lorsque les champignons de stockage l'attaquent pour utiliser ses huiles et d'autres nutriments. Cette réduction est influencée par la teneur en humidité des grains, la température de stockage, l'espèce de mycoflore impliqué et la durée de stockage (**Bose et al., 2008**).

I.5.1.2. Décoloration :

D'après **Brooker**, les moisissures de stockage provoquent une décoloration sévère des grains, *Aspergillus glaucus* provoque la décoloration du germe ; *Aspergillus candidus* peut se reproduire dans le blé à une teneur en eau de 15-15,5 % entraîne la décoloration de l'ensemble du grain. *Aspergillus flavus* se développe dans le blé entreposé à une teneur en eau supérieure à 18-18,5% et provoque une décoloration rapide du germe et du grain entier. Les moisissures du genre *Penicillium* qui exigent des teneurs en eau relativement élevées peuvent causer la décoloration du grain (**Botton et al., 1999**). La décoloration peut être causée par les champignons de champ et de stockage et peut entraîner un noircissement du germe de blé (**Boudra et al., 2009**).

I.5.1.3. Odeur :

La contamination fongique des grains de blé est responsable du rejet des odeurs indésirables. Il a été constaté que les grains stockés à des conditions d'humidité élevées ont une odeur de moisi (**Kermiche, 2012-2013**).

I.5.2. Modifications biochimiques du blé :

Au cours du stockage du blé, de nombreux changements biochimiques peuvent se produire et provoquent une diminution de la valeur nutritive du produit stocké en attaquant les glucides, les protéines, les lipides et les vitamines (**Udayakumar et al., 2009**).

I.5.2.1. Dégradation des lipides :

Les lipides des grains et notamment les triglycérides se révèlent particulièrement sensibles à la dégradation par les microorganismes. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérols et en acides gras grâce à des enzymes appelé « lipases », que l'on rencontre chez les moisissures (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*), les levures (*Candida*, *Pichia*) et les bactéries (*Bacillus*). Les acides gras sont dégradés chez les microorganismes aérobies et aéroanaérobies (*Pseudomonas*, *Entérobactéries*, levures, moisissures...) par la β -oxydation. L'évolution de l'acidité grasse est une des manifestations les plus sensibles des modifications biochimiques que subissent le blé au cours du stockage (**Kermiche, 2012-2013**) .

I.5.2.2. Dégradation des glucides :

La dégradation de la cellulose est assez rare et se limite à quelques moisissures et bactéries. L'amidon est hydrolysé par l'action d'amylases présentes dans les grains et l'amylase fongique et quelques bactéries et levures, cette dégradation fait intervenir des types d'enzymes selon l'espèce : L'alpha-amylase a une action endomoléculaire conduisant à la formation de maltose et d'une petite quantité de maltodextrine (*Bacillus*, nombreuses moisissures, quelques levures), gluco-amylase qui libère des unités glucose à partir des extrémités non réductrices des polymères (moisissures, levures et des bactéries) et la β -amylase qui a une action de type exomoléculaire donnant du maltose et des dextrines (*Bacillus*, levures et bactéries). Le glucose ainsi formé est utilisé par les champignons comme source d'énergie ou pour la production du sucre ribose utilisé pour la synthèse d'acide nucléique (**Bauer et al., 2010**).

I.5.2.3. Dégradation des protéines :

La plupart des protéases microbiennes sont spécifiques. Elles agissent aussi bien sur les protéines que sur les oligopeptides, il s'agit des enzymes généralement exocellulaires (**Guiraud et al., 2003**).

L'hydrolyse des protéines en polypeptides et en acides aminés assimilables par les microorganismes ne se fait que très lentement dans les conditions de stockage (**Multon et al., 1982**).

I.5.3. Production des mycotoxines dans le blé :

Certaines espèces de moisissures ont une préoccupation majeure en raison de leurs propriétés génotoxiques. Ils ont le potentiel de produire une gamme de métabolites secondaires toxiques appelés « mycotoxines ». Généralement ces métabolites sont produites dans le mycélium des moisissures, mais peuvent s'accumuler dans des structures spécialisées telles que les phialides, les conidies ou les sclérotés ainsi que dans le milieu environnant l'organisme (**Bhatnagar et al., 2002**). Du grec (mycos = champignon) et du latin (toxinum = poison), le terme « mycotoxine » désigne des substances chimiques produites par des moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxicogène se développant sur des denrées alimentaires brutes ou transformées surtout celles d'origine végétales (**Bourais et al., 2006**) Cependant, **Optis et al. (2012)** rapportent que plusieurs moisissures peuvent les utiliser dans le processus de la

dégradation de la matière organique tout comme les enzymes. Elles sont généralement produites par 5 principaux types de champignons, à savoir *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Pfohl-Leszkowicz et al., 1999). Il existe environ 2500 mycotoxines répertoriées, les plus rencontrées en agroalimentaire constituent les ochratoxines, les fumonisines, les trichotécènes et les aflatoxines. Ces dernières sont les plus redoutables toxines dans les céréales et les fruits secs (Bourais et al, 2006). La synthèse des mycotoxines est liée à des facteurs tels que la teneur en humidité, la température, la durée de stockage, le taux de contamination, de grains cassés, des impuretés, de taux d'oxygène, des dommages au cours du traitement de récolte et transport des grains (Brick et al., 2000). Une telle contamination peut conduire à la réduction et la dégradation de la qualité de blé, ce qui rend impropre à la consommation humaine et animale. Selon Terzi et al. (2014), on dénombre au minimum 30 mycotoxines extrêmement toxiques. Ces dernières présentent quatre modes de toxicité : aiguë, chronique, mutagénique et tératogénique (Reboux et al., 2006).

I.5.3.1. Aflatoxines :

Aflatoxines sont Mycotoxines produites par certaines souches d'*Aspergillus*, notamment *flavus* et *A. parasiticus*. Formées lors de la croissance de ces champignons sur des produits tels que les céréales (par exemple le maïs), les noix (par exemple les arachides) et les graines oléagineuses (par exemple le soja). La contamination peut avoir lieu avant et après la récolte. Les cultures hôtes sont particulièrement sensibles à l'infection après une exposition prolongée à une forte humidité ou à des dommages pendant la sécheresse. Une fois ingérées, les aflatoxines sont métabolisées par le foie en un intermédiaire réactif, l'aflatoxine M1. Elle est hépatotoxique et hépatocancérigène pour l'homme et les animaux, et peut entraîner une aflatoxicose. (IFIS., 2009).

I.5.3.2. Ochratoxines :

Les ochratoxines sont un groupe de mycotoxines produites par *Penicillium verrucosum* et différentes espèces de moisissures *Aspergillus* (*A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. niger*) qui contaminent les cultures en plein champ, entraînant une contamination par les ochratoxines des champs et du stockage (Bennett et al., 2003).

I.5.3.3. Trichothécènes :

Les trichothécènes sont l'une des principales classes de mycotoxines, provoquant un impact économique important sur les cultures céréalières chaque année (Parry et al., 1995). Les genres producteurs de trichothécène comprennent *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* et *Trichothecium* (Cole et al., 2003). Ces champignons, de l'ordre des Hypocreales, sont présents dans le monde entier et sont adaptés à la colonisation et à la croissance sur des substrats présentant une grande variété de disponibilité en humidité et de teneur en nutriments. Au sein du genre *Fusarium*, certaines espèces sont d'importants agents pathogènes des plantes et sont à l'origine de flétrissures, de brûlures et de pourritures des épis dans les céréales, en particulier le blé, l'orge, l'avoine et le maïs (Desjardins et al., 2006) Dans le blé stocké, l'optimum de production des mycotoxines du groupe trichothécènes par les moisissures du genre *Fusarium* est à température de 20-25°C (Yazar et al., 2008).

I.5.3.4. Zéaralénones :

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

I.5.3.5. Moniliformines :

Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de production de ce groupe de mycotoxine dans le blé : *Fusarium moniliforme*. L'optimum de cette production est dans les températures chaudes 25-30°C. (Kermiche, 2012-2013)



Chapitre III

Le biofilm

I. Biofilms :

Les biofilms sont le résultat du développement des microorganismes sur une surface vivante ou inerte. Ce mode de vie sessile est très avantageux pour les microorganismes qui y trouvent refuge pour vivre et survivre, les biofilms pouvant croître dans des conditions nutritionnelles qui ne permettent pas la croissance des cellules planctoniques. .(**Malek, 2012-2013**) Dans l'industrie agro-alimentaire (IAA), on trouve différents micro-organismes selon les aliments manipulés et/ou transformés. Ces derniers ont la capacité à former un biofilm s'ils ne sont pas éliminés. Or, la présence de biofilm en IAA est problématique. Une contamination des aliments distribués engendrera une perte économique et également un risque pour la santé du consommateur.(**Diabi, 2017-2018**). Les biofilms microbiens peuvent être bénéfiques ou causer des nuisances dans les environnements où ils se développent. Ils peuvent être impliqués dans les processus infectieux ou induire des effets néfastes en terme de qualité, d'hygiène et de santé publique. Au sein des biofilms, les microorganismes acquièrent de nouvelles caractéristiques phénotypiques notamment une résistance importante aux agents antimicrobiens (**Malek, 2012-2013**).

I.1. Définition :

La vie microbienne associée aux surfaces a reçu de nombreuses définitions construites autour des trois éléments clés du biofilm, qui sont le microorganisme, la surface et la matrice organique (**Marshall et al., 1971**). Celles-ci ont évolué en fonction de la perception et de la compréhension du phénomène et se sont affinées au fur et à mesure des découvertes réalisées sur le sujet. Dans une définition simple, proposée par **Carpentier et al (1993)**, le biofilm est une communauté de microbes incorporés dans une matrice de polymères organiques et adhérent à une surface. **Donlan (2002)** souligne le caractère solide de cet attachement des microorganismes aux surfaces : non enlevé par un rinçage doux. Toutefois et bien qu'il n'existe pas de consensus absolu sur la définition d'un biofilm, **Donlan et al (2002)** considèrent que toute nouvelle définition doit apporter des éléments d'information sur des aspects bien définis du biofilm, autres que les caractéristiques facilement observables telles que la croissance sur une surface et la production de matrice. Les autres attributs physiologiques des microorganismes en biofilm, notamment les taux de croissance altérés et l'expression de gènes non exprimés par les organismes planctoniques, en d'autres termes le phénotype biofilm, doivent être pris en considération. Sur cette base, ont proposé une définition plus complète : « un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules qui sont irréversiblement attachées, à un substratum, ou une interface ou les

unes aux autres, emprisonnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires autoproduites et exhibant un phénotype altéré par rapport au taux de croissance et à la transcription des gènes ». Enfin le terme société du biofilm a également été utilisé (**McDougald et al., 2012**), faisant allusion à l'organisation des communautés microbiennes du biofilm ainsi qu'aux systèmes de communication intercellulaire et de régulation des fonctions au sein de cet ensemble complexe et dynamique. Toutefois certains des concepts à la base des biofilms sont encore en plein évolution, notamment le système de communication intercellulaire ou quorum-sensing. Des études récentes ont montré que ce système de communication n'est pas uniquement liée à la densité cellulaire mais aussi à la localisation spatiale des cellules (**Timp et al., 2009**), ainsi qu'aux conditions hydrodynamiques qui règnent dans les systèmes fermés (**Janakiraman et al., 2009**).

I.2. Etapes de formation de biofilm :

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels ou sur tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quelque soit l'environnement qu'ils colonisent. La formation se fait généralement en cinq étapes (**Zinafi et al., 2017-2018**).

I.2.1. Adhésion réversible :

L'adhésion microbienne peut se diviser en deux étapes distinctes : l'adsorption réversible et l'adhésion irréversible (**Characklis et al., 1990**). L'adsorption réversible met en jeu des forces d'interaction différentes, notamment les forces de London-van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions de Lewis. L'ensemble est modélisé par la théorie dite XDLVO (**Van Oss et al., 1995**). Suite à cette adsorption, deux évolutions sont possibles : soit le microorganisme est désorbé et retourne dans la phase liquide, soit il parvient à rester fixé et passe donc à l'étape d'adhésion irréversible.

I.2.2. Adhésion irréversible :

L'adhésion irréversible se fait au moyen de deux mécanismes principaux. On observe d'une part la multiplication des liaisons faibles (type liaisons de van der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) dont le nombre compense le niveau d'énergie. D'autre part, il apparaît des ponts polymériques entre d'un côté les divers appendices, flagelles et pili et les EPS secrétées par la cellule, et de l'autre le support conditionné. Ainsi les microorganismes sont capables de se fixer de manière ferme et durable sur le support (**van Oss et al., 1995**).

I.2.3. Formation de micro-colonies :

le début de la croissance microbienne et de l'évolution de l'architecture du biofilm avec le développement des micro-colonies primaires (Ana Cecilia, 2017) La formation des microcolonies provient après l'adhésion à une surface biotique ou abiotique et la liaison devient stable, dont le résultat est la formation de micro-colonies (Coline et al., 2015) .

I.2.4. Maturation du biofilm :

C'est l'étape clé de la formation de biofilm. Elle est caractérisée par la sécrétion d'exopolymères contribuant, d'un côté, à la forte adhésion des cellules les unes aux autres et de l'autre, à la surface. Le biofilm grandit jusqu'à devenir macroscopique en condition optimales (Alnasouri, 2010) .

I.2.5. Dispersion du biofilm :

Le détachement des cellules associées aux biofilms intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition ou modification de la nature des nutriments disponibles. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Parot et al., 2007).

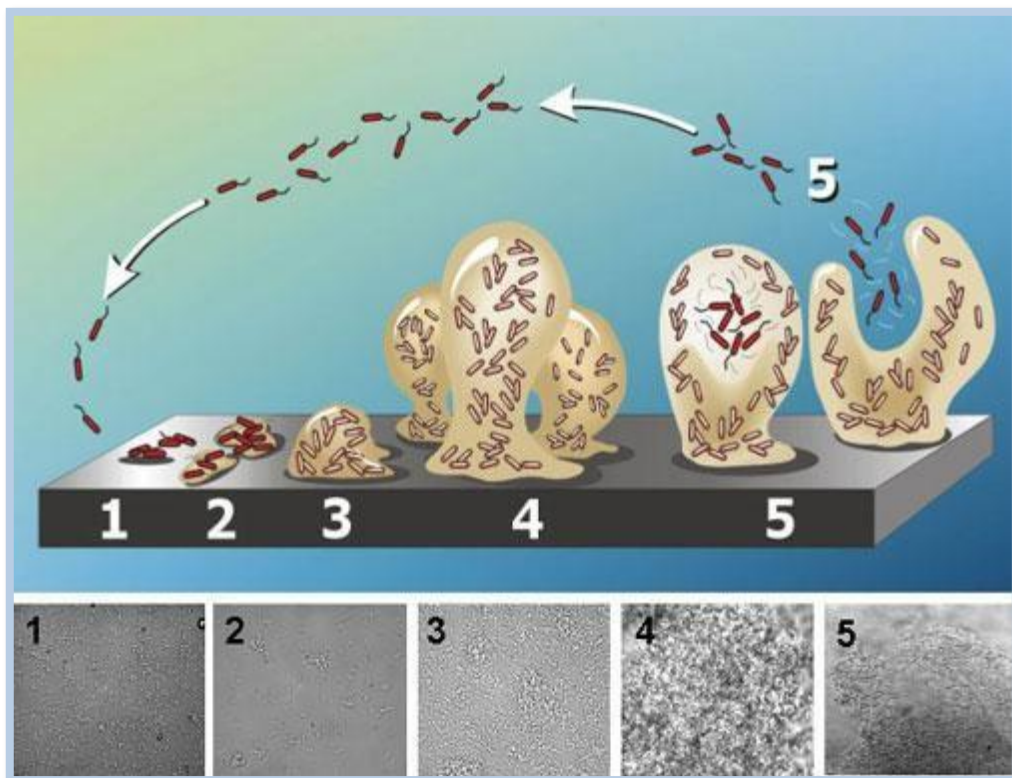


Figure I.2.5. Représentation schématique du processus de formation du biofilm, mettant en évidence les structures en tours en champignons (Malek, 2012-2013).

I.3. Facteurs influençant la formation de biofilm :

I.3.1. Caractéristiques de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée (**Donlan et al., 2002**).

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur : d'une part l'hydrophobicité, les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux et, d'autre part la présence d'un film protéique (**Bradshaw et al., 1997**).

I.3.2. Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs. On peut citer les facteurs suivants (**Martinez et al., 2007**) : température, pH (conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité), concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, sources de carbone disponibles, concentrations en nutriments : dans un milieu statique, La concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm (**Spormann et al., 2008**).

L'adhésion irréversible se fait au moyen de deux mécanismes principaux. On observe d'une part la multiplication des liaisons faibles (type liaisons de van der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) dont le nombre compense le niveau d'énergie (**Characklis et al., 1990**). D'autre part, il apparaît des ponts polymériques entre d'un côté les divers appendices, flagelles et pili et les EPS secrétées par la cellule, et de l'autre le support conditionné. Ainsi les microorganismes sont capables de se fixer de manière ferme et durable sur le support (**van Oss et al., 1995**).

L'hydrophobicité est une propriété inter-faciale directement liée à l'énergie de surface de Gibbs, qui est la somme nette des interactions attractives de van der Waals et des interactions électrostatiques (**Palmer et al., 2007**). Une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire créera une diminution équivalente dans l'excès de l'énergie de surface de Gibbs (**Liu et al., 2002**).

I.1.Objectif de l'étude :

Les silos de stockage du blé peuvent être soumis à la contamination par des microorganismes qui colonisent leurs surfaces en formant des biofilms. Le but de ce pratique est l'étude fongique de ces biofilms par la réalisation des cultures de prélèvements sur des milieux de cultures.

II.1. Lieu d'étude :

Les moulins MERABET sont situés a la zone d'activité de Naama ; d'une superficie de 20000 m² ,7500 m² est réservés pour la partie bâtie, ce dernier est élaboré pour acquérir une semoulerie 120 T/j, et une minoterie de 100 T/j extension, installé en Juillet 2007, l'infrastructure comporte aussi l'administration, le laboratoire, le magasin, le pont bascule.

II.2. Echantillonnage :

Tous les prélèvements ont été réalisés par grattage de la surface intérieure du silos de stockage (silos de repos)avec une spatule stérilisée à l'éthanol et au feu avant chaque prélèvement. Ces prélèvements ont été placés dans sachets stériles.

II.3. Préparation des milieux de culture

Dans le but d'isolement, de purification et identification moisissures présent dans ce biofilm , les milieux de culture utilisés sont :

- Milieu (DRBC)
- Milieu (MEA)
- Milieu (CDA)
- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Eau physiologique (EPh)
- PDA incliné

II.4. Dénombrement et isolement de la flore fongique :

Le dénombrement se réalise sur un milieu solide en boîtes de pétri en utilisant la méthode de dilution. Des dilutions en série dans des tubes d'eau physiologique stérile se réalisent pour chaque échantillon du biofilm : 10 g de l'échantillon sera peser et mélanger pendant 15 min avec 90 ml de l'eau physiologique stérile ajoutée des gouttes de tween 80 puis, 1 ml de la suspension obtenue sera prélever puis mélanger avec 9 ml de l'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de l'ordre de 10⁻¹. Ensuite, 1 ml de cette dernière sera prélever puis mélanger avec 9 ml de l'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de l'ordre de 10⁻² jusqu'à l'obtention de la dilution 10⁻⁶. 0.1 ml sera prélever et placer sur la gélose de PDA (Potato dextrose agar), DRBC (Dichloran rose bengal chloranphenicol), MEA et le milieu CDA. La composition des milieux de culture est mentionnée dans l'annexe. La présence de l'acide lactique et du chloramphénicol agent antibactérien, dans les deux premiers milieux de culture permet d'éviter la croissance bactérienne. Pour chaque échantillon, 60 boîtes de pétri (15 pour chaque milieu de culture, en ordre de 5 boîtes pour la dilution 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) sera inoculer par 0.1ml de la suspension. Les boîtes de pétri inoculées sera incubé à 25°C pendant 7 jours avant l'énumération. Les boîtes contenant entre 10 et 100 CFU (colony forming unity : unité formant colonie) sera utilisées pour le dénombrement. Les résultats sont exprimés en CFU par gramme d'échantillon. Si l'échantillon s'avère peu contaminé par les champignons c'est-à-dire que le nombre de colonies par boîtes est inférieur à 10, les boîtes de la plus faible dilution sont utilisées pour le dénombrement.

II.5. Purification des isolats :

Pour obtenir des isolats purs, des observations quotidiennes sera effectuées dès l'apparition des souches. Chaque isolat développé sera repiqué, à l'aide d'une anse de platine stérile, au centre de boîte de Pétri contenant un milieu PDA plus 30mg d'antibiotique, puis incubé à 30°C pendant 6 jours. En cas de contamination par une autre souche fongique, la purification des souches sera effectuée par le repiquage des disques des moisissures au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention des souches pures (**Guiraud, 2003**).

II.6. Identification des champignons :

II.6.1. Identification des genres :

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'identification de critères morphologiques ; d'une part par l'observation macroscopique du mycélium, et d'autre par l'observation microscopique des structures reproductrices.

II.7.1.1. Observation macroscopique :

a) L'aspect des colonies : elles peuvent être duveteuses, laineuses, poudreuses...etc.

b) Le relief des colonies : elles peuvent avoir un aspect plat ou plissé ainsi que leur consistance qui peut être friables, molles ... etc.

c) La taille des colonies : elles peuvent être petites 3 à 3.5 cm ou étendues 4 à 5 cm ou envahissantes.

d) La couleur des colonies : c'est un élément très important d'identification, les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, verte ou brune, des pigmentations peuvent se présenter sur le mycélium ou diffuser sur le milieu de culture.

II.7.1.2. Observation microscopique :

Cette dernière est réalisée par la technique de la culture sur lame qui a pour objectif l'examen des organes de fructification, souvent difficiles à observer sur les montages classiques (Chabasse et al., 2002). Elle consiste à ensemencer les souches sur les côtés de morceaux de PDA d'environ 5 mm d'épaisseur. Ces morceaux sont coupés à partir d'une boîte coulée en couche épaisse pour éviter la déshydratation du champignon, ensuite les porter sur des lames stériles et recouvrir de lamelles stériles.

Les lames sont déposées dans des boîtes de Pétrie tapissée avec du papier imbibé d'eau distillée stérile. Ces lames sont soulevées d'une tige en verre en forme de U qui est déposée au fond de la boîte de Pétrie. Refermer cette dernière et placer le tout à l'étuve. Après 2 à 3 jours d'incubation à 28 °C, sur de nouvelles lames stériles, on dépose une à deux gouttes de bleu de coton pour permettre le gonflement du mycélium facilitant ainsi l'observation microscopique, on soulève aseptiquement la lamelle couvrant le morceau de PDA inoculé, la déposer sur les gouttes du bleu de coton et procéder à l'observation microscopique.

III. Identification des champignons à l'aide d'outils moléculaires :

les mycologues ont traditionnellement utilisé la morphologie (caractères phénotypiques), telles que la production des spores formées à la suite d'une (mitose) ou la reproduction sexuelle (méiose), comme seul moyen de l'identification des espèces fongiques (**Hyde et al., 2010**) et même aujourd'hui, il est toujours adopté comme un moyen d'identification des espèces dans le cadre de l'étude mycologique. L'utilisation de la morphologie dans l'identification des espèces fongiques est très importante pour comprendre l'évolution de la morphologie des espèces fongiques. Cependant, les approches morphologiques des champignons cadre, bien qu'elle soit couramment utilisée dans la taxonomie des champignons pour la classification au niveau l'ordinal ou familial (**Wang et al., 2016**) ne peut pas toujours donner de bons résultats pour le niveau inférieur (espèces) (**Lutzoni et al., 2004**) pour les raisons exposées ci-dessous. Dans certaines lignées de champignons très spécifiques, les caractères morphologiques peuvent être controversées ou problématiques, même pour les mycologistes qualifiés, car ils ne peuvent pas toujours fournir des regroupements précis au sein d'une cadre évolutif, principalement au niveau des espèces (**Geiser et al., 2004**). Les caractéristiques morphologiques peuvent souvent être trompeuses en raison l'hybridation (**Olson et al., 2002**) la spéciation cryptique (**Harrington et al., 1999**) et l'évolution (**Brun et al., 2010**). En outre, jusqu'à récemment, il était de pratique courante en mycologie pour désigner les stades asexués et sexuels d'une même champignon, la plupart du temps sous un autre nom (appelé double nomenclature), ce qui a créé une confusion. Cette pratique n'est pas plus acceptable selon le dernier Code international de Nomenclature des algues, des champignons et des plantes (**Hibbett et al., 2013**). De plus, l'identification des champignons sur la base de leur seule morphologie peut être difficile, surtout quand aucun expert ne s'occupe cultures de champignons, puisqu'il existe un nombre limité des caractères morphologiques qui peuvent être utilisés pour l'identification. Par exemple, les souches de champignons endosymbiotiques, tels que les endophytes et les champignons endolicheniques, qui sont couramment utilisés pour isoler les métabolites secondaires, ne sont pas toujours sporulés en culture, ne fournissant ainsi aucun caractère phénotypique pour lequel les identifier en fonction de leur morphologie (**Hyde et al., 2008**). Pour les champignons qui sporulées dans la culture, les structures asexuées, telles que les conidies/ la forme et la taille des spores, peuvent souvent présenter des caractères très plastiques (**Huzefa et al., 2017**).

Dans les sections suivantes, nous examinons deux méthodes utilisées dans la mycologie pour l'identification des champignons sur la base de leur séquence, à savoir, Codage à barres de l'ADN en utilisant la région ITS et la taxonomie de l'ADN en utilisant un ou plusieurs gènes dans des alignements de séquences et l'utilisation d'outils de construction d'arbres pour estimer les relations phylogénétiques (Huzefa *et al.*, 2017).

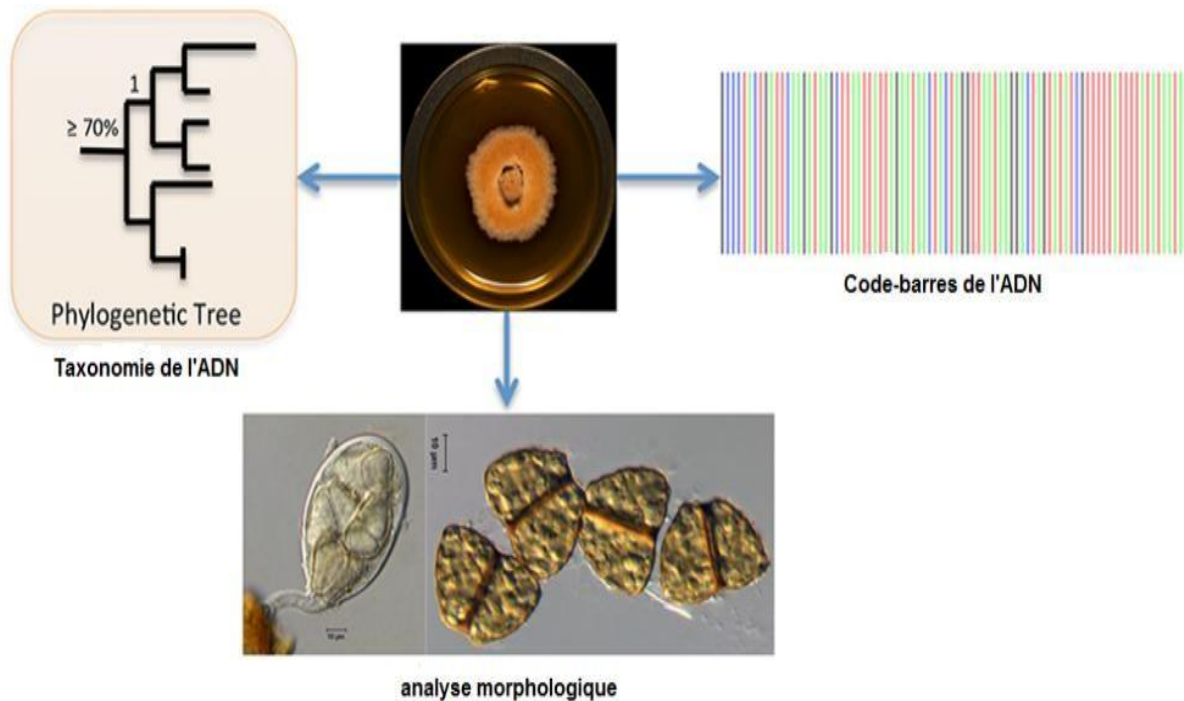


Figure III.1. Méthodes d'identification morphologiques et moléculaires des champignons (Huzefa *et al.*, 2017).

III.1. Les trois gènes ribosomiques nucléaires les plus communément utilisé pour l'identification des champignons:

L'utilisation des données moléculaires pour la l'identification des champignons a commencé il y a plus de deux décennies avec l'article de référence décrivant l'opéron nucléaire ribosomique fongique par **White et al.** Les séquences d'ADN fongique générées avec ces amorces pour la grande sous-unité (nrLSU-26S ou 28S), petite sous-unité (nrSSU-18S), et l'ensemble de la transcription interne (ITS1, 5.8S, ITS2 ; env. 0.45-0.80 kb) a inauguré une nouvelle ère de l'identification des séquences phylogénétiques moléculaires de la règne des champignons (**Brunset et al.**, 1991). Différents rythmes d'évolution, qui se traduisent par des niveaux différents de variation génétique, ont été observés pour ces trois régions distinctes, la

SSU étant celle qui évolue le plus lentement, donc qui présentent le plus faible degré de variation entre les taxons, tandis que l'ITS évolue le plus rapidement et présente le plus haut (**Brunset et al., 1991**). Si un chercheur s'intéresse au placement phylogénétique d'un champignon à des niveaux taxonomiques supérieurs (famille, ordre, classe, et phylum), le SSU peut être amplifié et séquencé en utilisant la combinaison d'amorçage NS1 et NS4 (**White et al., 1990**). Alternativement, si l'identification doit être faite aux niveaux taxonomiques intermédiaires (famille, genre), l'utilisateur peut aussi amplifier et séquencer le LSU à l'aide de l'amorce combinaison LROR et LR6 (**Vilgalys et al., 1990**). La région LSU, qui contient les domaines hypervariables D1 et D2, sur son propre ,ou lorsqu'il est combiné avec la région ITS, peut également être précieux pour l'identification des champignons (**Porras-Alfaro et al., 2014**). Pour l'identification des espèces , le ITS est le plus utile, car il est le plus rapide partie évolutive du cistron de l'ARNr (figure 2). En raison de sa facilité dans l'amplification, l'utilisation généralisée et l'ampleur appropriée l'écart entre les codes à barres (c'est-à-dire la différence entre les codes interspécifiques et variation infraspécifique), le SIR a été choisi comme code à barres pour les champignons par un consortium de mycologues (**Schoch et al 2012**). Ainsi, pour la recherche sur les produits naturels, les deux premiers domaines du LSU et toute la région ITS devrait être séquencée en raison leur forte prévalence dans la taxonomie et la systématique des champignons. Alors que le Les LSU peuvent être utilisés dans les analyses phylogénétiques pour déterminer les relations entre les espèces, le ITS peut être utilisé seul ou en conjointement avec d'autres gènes codant pour des protéines pour l'identification des espèces. Ces gènes ont été largement utilisés dans les grandes études marquantes en matière de systématique fongique, telles que assemblage de l'arbre de vie fongique (AFTOL)(**James et al., 2016**). Ainsi, il existe un grand nombre de séquences d'ARNr fongique dans GenBank pour l'identification des espèces par code-barres et l'analyse phylogénétique (**Huzefa et al., 2017**).

III.2. Méthodes utilisées dans la construction de l'arbre phylogénétique :

Comme le code-barres de l'ADN, la taxonomie de l'ADN est basée sur le principe de l'utilisation de la variation génétique inhérente à des séquences de différents individus pour identifier les taxons. Toutefois, la différence entre ces deux méthodes est que dans cette dernière, une inconnu est identifié sur la base d'une hypothèse phylogénétique (**Tautz et al., 2003**), préconisant ainsi une perspective évolutive pour la reconnaissance des espèces fongiques et en utilisant une approche ayant une valeur prédictive (**Geiser et al., 2004**). La

taxonomie de l'ADN pour un groupe particulier des champignons peut être basée sur une ou plusieurs régions de codage des protéines ou de l'ADNr et peut être dérivés des méthodes phylogénétiques utilisant n'importe quelle région génétique individuellement ou en combinaison (**Vogler et al., 2007**). Alors que la taxonomie basée sur l'ADN en utilisant la théorie phylogénétique ne permet pas toujours d'identifier l'espèce exacte d'un champignon, il sera certainement utile en plaçant un des espèces inconnues au sein d'un clade ou d'un groupe phylogénétique, donc en fournissant une identification d'espèce supposée. Un résumé de méthodes et logiciels utiles pour effectuer des analyses déduisant ou utilisant des arbres phylogénétiques a été récemment publié par Schmitt et Barker (**Schmitt et al., 2009**) . Lorsque les espèces sont identifiées à l'aide de séquences qui partagent une ascendance commune (séquences homologues), il peut être possible de prévoir les attributs des espèces, tels que l'écologie. **Taylor et al (1990)** ont établi le modèle généalogique de la reconnaissance des espèces phylogénétiques de concordance (GCPSR) pour définir les limites des espèces sexuelles en se basant sur concordance phylogénétique de multiples locus génétiques non liés l'utilisation de gènes communs (**Taylor et al., 2003**). Le concept de GCPSR est l'identification des champignons, car elle a des pouvoir discriminatoire par rapport à d'autres concepts d'espèces, tels que les concepts d'espèces morphologiques et d'espèces biologiques (**Harrington et al., 1999**). Bien que le GCPSR exige deux ou plusieurs locus génétiques pour définir. Selon **Geiser et al (2004)**, un seul marqueur génétique pourrait être utilisé pour fournir une identification générale de l'espèce. A le flux de travail d'identification des champignons par le séquençage ITS-LSU. Une fois que les gènes ribosomiques fournissent un indice du groupe, tel que la famille ou le genre, les gènes codant pour les protéines nucléaires pourrait être utilisé via la recherche BLAST et/ou la recherche phylogénétique pour fournir une identification plus concluante au niveau de l'espèce. Pour assembler un arbre phylogénétique, les approches traditionnelles telles que l'algorithme de jonction des voisins (basé sur la distance) et la parcimonie (basé sur l'affirmation que la meilleure hypothèse phylogénétique nécessite le plus petit nombre de pas d'évolution) ont été utilisés précédemment. Toutefois, ces deux types de mesures ont été remplacés par des méthodes plus rapides basées sur des modèles, telles que la probabilité maximale et Inférence bayésienne. Cela s'explique en grande partie par le fait que la distance et les méthodes basées sur la parcimonie ne sont pas performantes avec les séquences qui évoluent à des rythmes différents (**Holder et al., 2003**). Un résumé des forces et faiblesses des différentes reconstructions d'arbres est fournie par Yang et Rannala (**Yang et al., 2012**).

III.2.1. Probabilité maximale :

Le critère d'optimalité en matière des méthodes de probabilité consiste à trouver l'arbre phylogénétique avec méthodes probabilité et il est basé sur un modèle stochastique de l'évolution de la séquence des nucléotides ou des acides aminés. Pour la théorie sur l'estimation de la phylogénie basée sur le maximum de vraisemblance, l'utilisateur devrait faire référence à Felsenstein (**Felsenstein et al., 1981**), qui a été l'un des premiers qui utilise cette approche pour l'estimation phylogénétique via la séquence d'ADN données (**Huzefa et al., 2017**).

II.2.2. Inférence bayésienne :

L'inférence bayésienne, basée sur le théorème bayésien, a été introduit à la phylogénétique moléculaire au début de l'année 2000 en raison de la disponibilité des modèles de complexe évolutionnaire (**Huelsenbeck et al., 2001**). L'inférence bayésienne de la phylogénétique est similaire à celle de la probabilité maximale dans la mesure où l'utilisateur postule un modèle de évolution et le logiciel recherche le meilleur arbre qui est compatible avec le modèle et les données (c'est-à-dire le alignement). Toutefois, l'inférence bayésienne diffère de l'inférence maximale probabilité en ce sens que, tandis que ce dernier cherche l'arbre qui maximise la probabilité des données de séquence données dans l'arbre, l'inférence bayésienne cherche l'arbre qui maximise la probabilité de l'étant donné les données et le modèle d'évolution de la séquence. Alors que le La méthode bayésienne a un lien étroit avec le maximum probabilité, il permet de mesurer plus rapidement le support de clade et se distingue du maximum de vraisemblance en ce qu'il permet des modèles d'évolution des nucléotides ou des acides aminés à être mise en œuvre (**Holder et al., 2003**). La théorie de l'inférence bayésienne basée sur les estimations de la phylogénie ont été revues (**Schmitt et al., 2009**).

IV. Matériels et méthodes:

IV.1. Les isolats :

Les isolats inclus dans cette étude représentent 13 des espèces les plus courantes décrites dans *Penicillium* sous-genre *Biverticillium*. Plusieurs isolats ont été étudiées pour chaque espèce et comparées au type ou à des souches considérées comme typiques de l'espèce.

Certains isolats ont été obtenus à partir du CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), IMI (International Mycological Institute), MUCL (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve) et CMPG (Collection de Mycologie de Pharmacie de Grenoble) des collections de culture et sont aujourd'hui conservé à la collection de culture du Muséum National d'Histoire Naturelle (LCP) (Joëlle et al., 2006).

IV.2. Conditions de culture :

Les cultures ont été cultivées à 25 °C pendant sept jours selon le régime standardisé décrit par Pitt. Les trois supports standard, l'extrait de malt Agar (MEA), Czapek Yeast Extract Agar (CYA) et les géloses au nitrate de glycérol (G25N), sont décrites dans annexes. Les cultures ont également été cultivées à 5 °C et 37 °C pour le CYA. Études phénotypiques. Les morphologies des colonies et les ont été examinées sur toutes les boîtes à sept jours, et les caractéristiques morphologiques générales ont été observées au microscope de la MEA (Joëlle et al., 2006).

IV.3. Extractions d'ADN, amplifications PCR et séquençage :

L'ADN génomique a été extrait du mycélium frais cultivé sur MEA (Extrait de malt 2%, Agar 2%) pendant deux jours en utilisant un CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) méthode de micropréparation. La PCR a été réalisée dans 50 µl réactions, en utilisant 25 µl d'ADN modèles, 1,25 unités de Taq ADN polymérase (Q-BIOgene, Illkirch, France), 5 µl de 10X Taq DNA Polymerase buffer, 5 µl de 50% de glycérol, 2 µl de 5 mM dNTPs (Eurogentec, Seraing, Belgique), 2 µl de chaque 10 amorces µM et 50-100 ng d'ADN modèle. Le site l'ensemble d'amorces oligonucléotidiques ITS4 et ITS5 a été utilisé pour amplifier la région ITS de l'ADNr. Les amplifications étaient réalisée sur un modèle de thermocycleur Perkin Elmer Cetus 2400 en utilisant les paramètres suivants : un pas de 4 min à 94 °C, suivie de 30 cycles de 15 s à 94 °C, 15 s à 50 °C et 20 s à 72 °C, puis une dernière prolongation de 2 min à 72 °C. Le séquençage de l'ADN a été effectué sur les deux brins utilisant le cycle ABI PRISM™ Dye Terminator Kit de réaction prêt au séquençage (Applied Biosystems) avec l'ensemble des amorces d'amplification et amorces internes ITS2 et ITS3 pour la région ITS . Les essais de séquençage ont été analysé sur un séquenceur d'ADN automatisé ABI PRISM 377. Les séquences de nucléotides ont été alignées à l'aide de l'algorithme Bio-Éditer le programme (Joëlle et al., 2006).

IV.4. Restriction des digestions enzymatiques :

Cartes complètes des restrictions des séquences ITS ont été définies à l'aide du programme BioEdit pour les souches types des différentes espèces. Le site combinaison de cinq enzymes,

parmi les plus courantes, Ava I, Ava II, Hae III, Hha I et Rsa I était nécessaire pour différencier les espèces étudiées. Aliquotés de 10 µl de les ADN amplifiés ont été digérés avec deux unités d'Ava I, Ava II, Hae III, Hha I (Qbiogène, Illkirch, France) et Rsa I (Fermentas/Euromedex, Mundolsheim, France) en suivant les instructions du fabricant. Toutes les enzymes a donné une digestion complète des ADN dans le tampon PCR, rendant inutile de purifier l'ADN avant la digestion. Les fragments de restriction ont été séparés sur 2 gels d'agarose "petits fragments" (Eurogentec), colorés avec bromure d'éthidium (10 µg/µl) et photographié sous UV lumière. Les marqueurs de taille moléculaire étaient le "Superladderlow 20 bp ou 100 bp Ladder" (Eurogentec) (Joëlle et al., 2006).

IV.5. Analyse des profils de restriction :

les profils de restriction ont été comparées sur la base du poids moléculaire des bandes corrélé à la présence ou à l'absence de sites de restriction. L'analyse de groupes de paires non pondérées en utilisant des moyens arithmétiques (UPGMA) a été utilisé pour examiner l'identification de l'isolat en référence à des souches de type ex de l'espèce *Penicillium* du sous-genre *Biverticillium* (Joëlle et al., 2006).

V. Résultats :

L'amplification PCR de la région ITS a permis de produit unique d'environ 620 pb pour tous les isolats. Les exceptions sont les LCP 90.2602, LCP 00.4464, FRR 1868, CMPG 610 et CMPG 244 qui ont produit un fragment de 1000 bp, y compris un intron dans l'ITS1 (données non présentées). Les fragments PCR de 60 isolats ont été digérés avec cinq enzymes de restriction : Ava I, Ava II, Hae III, Hha I et Rsa I. Bandes de moins de 50 pb étaient difficiles à visualiser sous les conditions d'électrophorèse utilisées. La méthode de restriction a permis d'identifier la plupart des espèces étudiées *Penicillium aculeatum*, *Penicillium erythromellis*, *P. islandicum*, *P. minioluteum*, *P. piceum*, *P. purpurogenum*, *P. rubrum*, *P. rugulosum*, *P. variable* et *Penicillium verruculosum*. Une étude intraspécifique de La variabilité a été observée chez *P. funiculosum* et *P. pinophilum*. *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* était indiscernable du génotype prédominant observé pour *P. funiculosum* (Joëlle et al., 2006).

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip on top, both ending in rounded, curled ends.

Conclusion générale

Les champignons filamenteux sont des microorganismes ubiquitaires dont le rôle principal est le recyclage de la matière organique. Leur diversité est très importante (environ 1,5 millions d'espèces dans le monde entier). Certains d'entre eux peuvent être utiles à l'homme alors que d'autres s'avèrent très dangereux. En effet, ils peuvent être utilisés pour la production d'aliments et la synthèse de médicaments. Cependant, la contamination par les moisissures représente un réel problème dans le secteur agroalimentaire, dans les industries pharmaceutiques et cosmétologiques ainsi que dans le domaine de la santé publique. Un des problèmes majeurs dans le secteur agro-alimentaire est la contamination, souvent constatée à la surface des instruments de l'industrie en formant un biofilm, la surface des produits destinés à l'alimentation, et en particulier des denrées stockées, entraînant des pertes économiques importantes, cette contamination fongique provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives)

Actuellement, les méthodes d'identification des champignons filamenteux utilisées en routine sont essentiellement basées sur l'analyse des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes sont souvent longues et laborieuses, manquent de précision et d'objectivité, et requièrent une bonne connaissance du domaine de la mycologie en raison de la grande diversité des souches de champignons. Depuis plusieurs années, les techniques de biologie moléculaire se sont considérablement développées en tant qu'outil complémentaire d'identification des champignons

Depuis plus de 15 ans, ces méthodes moléculaires ont pris une place prépondérante dans la taxonomie des espèces fongiques en général et des champignons filamenteux en particulier. La démonstration de l'intérêt des séquences des gènes codant les ARN ribosomiques (pour les études phylogénétiques) a permis d'affiner la distinction des groupes taxonomiques et des espèces chez les champignons. Dans la plupart des cas, ces outils sont largement utilisés pour déterminer l'identité correcte des moisissures au niveau du genre et de l'espèce.



Références bibliographiques

- Adams Martin R., Moss Maurice O. (2008). Food microbiology. RSC Publishing. The Royale Society of Chemistry. Third Edition; 463P.
- Afssa, (2006). "Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique.
- Agag B.I. (2004). Mycotoxins in foods and feeds 3-Zearalenone. Ass. Uni. Bull. Environ. Res. Vol 7, N°2.
- Alfaro, M. E.; Zoller, S.; Lutzoni, F. Mol. Biol. Evol. 2003, 20, 255–266.
- Ana Cecilia de Andrade Pinho Medeiros. Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Thèse de doctorat, Université de Grenoble Alpes France (2017) : 141 pp+annexes.
- Andersen B., Kroger E., Roberts R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria Arborescens*, *Alternaria Infectoria* and *Alternaria Tenuissima* species-groups. Mycological Research., Vol 16: 170-180.
- Bauer Werner J., Badoud Raphaël., Lölinger Jürg., Etournaud Alain. (2010). Sciences et technologies des aliments. Principe de chimie des constituants et de technologie des procédés. Presses polytechniques; 720 P.
- Belyagoubi larbi. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de Magistère en Biologie, Université de Boubaker Belkaid Tlemcen,(2007) : 68 pp +annexes.
- Bennett, J.W., Klich, M., (2003). Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 497-516p
- Ben chiban Tassadit. «Détermination de l'activité antioxydante de deux céréales : blé dur et blé tendre». Mémoire d'ingénieur d'état en contrôle de qualité et analyse, université de Béjaia, (2012-2013) : 39 pp+annexes.
- Berhaut P., Le Bras A., Niquet G., Griaud P., 2003- Stockage et conservation des grains à la ferme, ARVALIS, Institut du végétale, Ed. Tec et Doc, Paris, 108 P.
- Bhatnagar Deepak., Yu Jiujiang., Ehrlich Kenneth C. (2002). Toxins of filamentous fungi. Fungal Allergy and Pathogenicity. Chem Immunol. Basel. Karger. Vol 8: 167-206.
- Boiron, P (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P : 13-19-69-79.
- Brick N.M.M., Lorini I., Scussel V.M. (2000). Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest. *9th International Working Conference on stored Product Protection*.

- Bose Bandana., Hemantaranjan A. (2008). Developments in physiology, biochemistry and molecular biology of plant. Vol 2. New India Publishing Agency; 369 P.
- Botton B., Beton A., Fever M., Gaithier S., Guy p.h., Larpent J.P., Reymond P. Sanglier J.J., Vayssie Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2eme edition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.
- Boudra, H., 2009 - Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants. *Fourrages*, 199, 265-280.
- Bradshaw D.J. (1997). Effect of Conditioning Films on Oral Microbial Biofilm Development. *Biofouling*. 11(3): p. 217-226.
- Brun, S.; Silar, P. In *Evolutionary Biology – Concepts, Molecular and Morphological Evolution*; Pontarotti, P., Ed.; Springer: Berlin Heidelberg, 2010; pp 317–328.
- Bruns, T. D.; White, T. J.; Taylor, J. W. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1991, 22, 525–564.
- Boudreau A., Ménard G., 1992. Le blé : éléments fondamentaux et transformation. Ed : Presses Université Laval, Paris. Pp 25 - 439.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989). *Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Lavoisier. Paris. P : 216-244.
- Bourais I., & Amin A., 2006- Aflatoxines toxiques redoutables dans nos aliments, *Les technologies de laboratoire*, 4-8 pp.
- Butt M.S., Nasir M., Akhtar S., Sharif K., 2004- *Internet journal of food safety*, Vol 4 : 1-6.
- Cahagnier B. (1996). Céréales et produit dérivé In « microbiologie alimentaire » tome 1 « aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». Edition Technique et Documentation Lavoisier., Paris : 392-414.
- Carpentier B., O. Cerf. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygien in the food industry-a review. *Journal of applied bacteriology*, 75: 499-511.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., & Penn P., 2002- Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier N°25 de formation de biologie médicale*, 157 pp.
- Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noël T., Villard j. 2005- Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires*, N°373 :61-66.

- Characklis WG., McFeters GA., Marshall KC., (1990). Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis WG., Marshall KC., eds. Biofilms. New York: John Wiley & Sons, 341-394.
- Chawla K., 1984. Management of Cereal Grain in Storage. AGRI – FACTS, Practical Information for Alberta's Agriculture Industry, Agdex.
- CIC., 2000- Rapport annuel du Conseil International des Céréales "CIC" pour l'année 2000.
- Cole, R.A.; Jarvis, B.B.; Schweikert, M.A. Handbook of Secondary Metabolites; Academic Press: New York, NY, USA, 2003; pp. 199–560
- Coline Pessereau. Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale. Thèse de doctorat, Université de Nantes Angers Le Mans France (2015) : 164 pp+annexes.
- Clément Debiton. Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. Thèse de Doctoret en physiologie et génétique moléculaires, Université Blaise Pascal France,(2010) : 132 pp+annexes.
- Dealarras C., 2007- Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec &Doc ; éditions médicales internationales, pp 776
- Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T. (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. Cloning. and characterization Microbiology. 148: 1305-1315.
- Dendy, D.A.V., DOBRASZCZYK. (2000). Cereals and Cereal Products: Technology and Chemistry. Springer, 370p.
- Desjardins, A.E. Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology; APS Press: Eagan, MN, USA, 2006; pp. 1–260
- Devies M-K., Banu A-R., Gnanaprabhal G-R., Pradeep B-V et Planiswamy M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian J. Sci. Technol. 1(7). 1-6.
- Diaby Kadi. Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination. Mémoire de master en sciences biologique, Université de Lille 2 France, (2017-2018) :49 pp+annexes.
- Dijksterhuis, JAN., SAMSON ROBERT, A. (2007). Food mycology. A multifaceted Approach to fungi and food. CRC Press, 403P.

- Donlan RM. (2002) Biofilms: Microbial life on surface. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), 881-890.
- Doumandji A, Doumandji-Mitiche B, Salaheddine D. (2003). Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. In Office des Publications Universitaires, 1-22p.
- Dufresne P., & St-Germain G., 2013- Identification des champignons d'importance médicale : Stage de laboratoire, Laboratoire de Santé Publique du Québec, 57 p.
- Duron, B. S.1998-1999. Le transport maritime des cereales. Mémoire pour le D.E.S.S. "Transports maritimes et aériens ".Option Droit maritime et Droit des transports.Faculté de droit et de science politique d'atx-marseille. 81 pages.
- Eberhardt, U. In DNA Barcodes: Methods and Protocols; Kress, J. W.; Erickson, L. D., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; pp 183–205.
- El-Elimat, T.; Raja, H. A.; Figueroa, M.; Falkinham, J. O., III; Oberlies, N. H. *Phytochemistry* 2014, 104, 114–120.
- Evers, T, Millar, S, 2002. Cereal grain structure and development: some implication for quality. *Journal of Cereal Science* 36, 261-284.
- Gardes, M.; White, T. J.; Fortin, J. A.; Bruns, T. D.; Taylor, J. W. *Can. J. Bot.* 1991, 69, 180–190.
- Feillet Pierre. (2000). Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA.Paris; 308 P.
- Felsenstein, J. J. *Mol. Evol.* 1981, 17, 368–376.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.*, 33(1), 85-102p.
- Fredot E, 2012. Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. 3ème édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 613p.
- Gacem M.A., Ould El Hadj Khelil A. Et Gacemi B., 2011. Etude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importe stocke au niveau DeL'office Algérien
- Gacem Mohamed Amine. Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké.
- Gibson A.M., Baranyi J., Pitt J.I., Eyles M.J. et Roberts T.A., 1994- Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Food Microbiology* 23 (1994) 419-431.

- Geiser, D. M. In *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*; Springer, 2004; pp 3–14.
- Giraud J. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Edition Donod, Paris. P : 8-101.P : 330
- Gock M.A., Hocking A.D., Pitt J.I., Paulos P.G., 2003- Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi, *International Journal of Food Microbiology*, 81 : 11-19.
- Guindon, S.; Delsuc, F.; Dufayard, J. F.; Gascuel, O. *Methods Mol. Biol.* 2009, 537, 113–37.
- Guiraud J P., & Rosec J P., 2004- *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*, Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France, 300pp
- Gwimer J., Harnisach R., Mück O., 1996. *Manuel sur la manutention et la conservation des graines après récolte*. Ed : Eschborn. P : 368.
- Hall, B. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual*; Sinauer Associates, 2004.
- Haras D. (2005) .*Biofilms et altérations des matériaux : de l’analyse du phénomène aux stratégies de prévention*. *Matériaux & Techniques* 93, 27–41 Hors-Série.
- Harrington, T. C.; Rizzo, D. M. In *Structure and Dynamics of Fungal Populations*; Worrall, J. J., Ed.; Kluwer Press: Dordrecht, The Netherlands, 1999; pp 43–71.
- Hawksworth, D. L. *IMA Fungus* 2012, 3, 15–24.
- Hillis, D. M.; Bull, J. J. *Syst. Biol.* 1993, 42, 182–192.
- Holder, M.; Lewis, P. O. *Nat. Rev. Genet.* 2003, 4, 275–284.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. *Bioinformatics* 2001, 17, 754–755.
- Hughes, K. W.; Petersen, R. H.; Lodge, D. J.; Bergemann, S. E.; Baumgartner, K.; Tulloss, R. E.; Lickey, E.; Cifuentes, J. *Mycologia* 2013, 105, 1577–1594.
- Huzefa A. Raja,† Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, and Nicholas H. Oberlies. *Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community*, *Journal of Natural Products*, February (2017) : pp 756–770.
- Hyde, K. D.; Soyong, K. *Fungal Divers.* 2008, 33, 163–173.
- Hyde, K. D.; Abd-Elsalam, K.; Cai, L. *Mycotaxon* 2010, 114, 439–451.
- Interprofessionnel Des Céréales (OAIC) de La Localité De Saida (Algérie). *Algerian journal of arid environment* vol. 1, n° 2, Décembre 2011: 67-76.
- James, T. Y.; Kauff, F.; Schoch, C. L.; Matheny, P. B.; Hofstetter, V.; Cox, C. J.; Celio, G.; Gueidan, C.; Fraker, E.; Miadlikowska, J. *Nature* 2006, 443, 818–822.

- Janakiraman V, Englert D, Jayaraman, A, BaskaranH. 2009. Modeling growth and quorum sensing in biofilm grown in microfluidic chamber. *Ann. Biomed Eng.*, 37: 1206-16.
- Jean-François Cruz, Joseph D. Hounhouigan, Francis Fleurat-Lessard. La conservation des grains après récolte. *Quae*, (2016) :pp229.
- Joëlle Dupont, Bruno Denetière, Claire Jacquet and Marie-France Roquebert. PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species, *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 145-150.
- Kermiche Meryem. Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. Mémoire de magistère Sciences Alimentaires, Université de CONSTANTINE 1, (2012-2013) : 91 pp+annexes.
- Ko, T. W. K.; Stephenson, S. L.; Bahkali, A. H.; Hyde, K. D. *Fungal Divers.* 2011, 50, 113–120. Leveau, S. B., Bouix, M. (1993). *Les microorganismes d'intérêt industriel*. Lavoisier Apria, 110-163p.
- Liu Y., Tay J.-H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, Vol. 36, p. 1653-1665.
- Lutzoni, F.; Kauff, F.; Cox, C. J.; McLaughlin, D.; Celio, G.; Dentinger, B.; Padamsee, M.; Hibbett, D.; James, T. Y.; Baloch, E.; Grube, M.; Reeb, V.; Hofstetter, V.; Schoch, C.; Arnold, A. E.; Miadlikowska, J.; Spatafora, J.; Johnson, D.; Hambleton, S.; Crockett, M.; Shoemaker, R.; Hambleton, S.; Crockett, M.; Shoemaker, R.; Sung, G. H.; Lücking, R.; Lumbsch, T.; O'Donnell, K.; Binder, M.; Diederich, P.; Ertz, D.; Gueidan, C.; Hansen, K.; Harris, R. C.; Hosaka, K.; Lim, Y. W.; Matheny, B.; Nishida, H.; Pfister, D.; Rogers, J.; Rossman, A.; Schmitt, I.; Sipman, H.; Stone, J.; Sugiyama, J.; Yahr, R.; Vilgalys, R. *Am. J. Bot.* 2004, 91, 1446–1480.
- Lücking, R.; Dal-Forno, M.; Sikaroodi, M.; Gillevet, P. M.; Bungartz, F.; Moncada, B.; Yáñez-Ayabaca, A.; Chaves, J. L.; Coca, L. F.; Lawrey, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, 111, 11091– 11096.
- Magan N., Olsen M., 2004. Mycotoxines in food: Detection and control. *F.Sc.Technol.* pp:190-203.
- Malek Fadila. Le biofilm en industrie laitière : caractérisation, facteur de développement et élimination. cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat, Université de Boubaker Belkaid Tlemcen, (2012-2013) : 168 pp+annexes.

- Mallek Houda. Contribution à l'étude de la mycoflore associée aux grains de blé et d'orge dans la wilaya de Bouira. Mémoire de master en sciences Agronomiques, université de Bouira, (2017) : 58 pp+annexes.
- Marshall KC., (1985). Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In : Savage DC. and Fletcher M. eds. Bacterial adhesion. Plenum Publishing Corp., New York, 133-161.
- Martinez LR, Casadevall A (2007). Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Appl. Environ. Microbiol. 4592- 4601.
- Mathew Shiju., Thomas George., Tufail Ahmad. (2011). An Evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal Journal of Biotechnology.*, Vol 1: 9-13.
- Mathieu CHARLES. Évolution des génomes du blé (genres Aegilops et Triticum) au sein des Poaceae. Mémoire de Doctorat en sciences, l'université d'Évry-Val d'Essonne France,(2010) : 124 pp+annexes.
- McDougald D., S. A. Rice, N. Barraud, P. D. Steinberg, S. Kjelleberg. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10: 39-50.
- Meghazi Nassima. Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké. Mémoire de magistère en sciences agronomiques, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, (2015) : 97 pp+annexes.
- Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée, Université des Frères Mentouri Constantine1, (2018) : 56 pp+annexes.
- Moreau C., 1996- les mycotoxines. In : Bourgeois C. M., Mesclé J.-F., Zucca J. (coord.). *Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Ed. Tec & Doc. Paris, pp.176-185.
- Muatasem Alnnasouri. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat, Université de Nancy France (2015) : 157 pp+annexes.
- Multon, J.L., 1982. Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Derivés ; Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. *Technique & Documentation Lavoisier*, Paris, pp. 576.

- Nedjah Imene. Changements physiologiques chez des plantes (Blé dur *Triticum durum* Desf.) exposées à une pollution par un métal lourd (plomb). Thèse de Doctoret en biologie végétale et environnement, Université Badji Mokhtar Annaba,(2014-2015) : 98 pp+annexes.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. P : 210-216.
- Olson, Å.; Stenlid, J. *Microbes Infect.* 2002, 4, 1353–1359.
- Optis M., Shaw K., Stephenson P., et Wild P., 2012- Mold Growth in On-Reserve Homes in Canada: The Need for Research, Education, Policy, and Funding., *Journal of Environmental Health.*, Vol. 74 N°6: 14-21.
- Palmer J., Flint S., Brooks J (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm.*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 34, p. 577-588.
- Parry, D.W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review.* *Plant Pathol.* 1995, 44, 207–238
- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Métabolisation des mycotoxines. Effets biologiques et pathologies Ecotoxicogène. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. *Technique et Documentation*, Paris, 18- 35p.
- Pitt J.I. 1988. *Laboratory guide to common Penicillium species*, Academia Press editor, London.
- Pomeranz, Y, 1988. Chemical composition of kernel structures. *Wheat: chemistry and technology.* Volume I., 97-158.
- Posada, D.; Buckley, T. R. *Syst. Biol.* 2004, 53, 793–808.
- Porrás-Alfaro, A.; Liu, K. L.; Kuske, C. R.; Xie, G. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 829–840.
- Proctor, D.L., 1995 - Techniques d'emmagasiner des grains : évolutions et tendances dans les pays en développement, *Bulletin des services agricoles de la FAO* n°109, FAO, Rome.
- Promputtha, I.; Miller, A. N. *Mycologia* 2010, 102, 574–587.
- Rastoin J.L., & Benabderrazik L.H., 2014- Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb Pour un co-développement de filières territorialisées. Rapport de recherche, Institut de Prospective Economique du Monde Méditerranéen,(2014) : 132 pp + annexes.
- Reboux G., Roussel S. et Grenouillet F., 2006- Moisissures de l'environnement agricole *Fungi in agricultural environment.*, *Journal de Mycologie Médicale* 16: 248–

262.

- Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., et Million L., 2010- Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, Revue française d'allergologie 50 : 611–620.
- Rogers SO, Blendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 1985; 5: 69-76.
- Salemi, M.; Vandamme, A.-M. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*; Cambridge University Press, 2003.
- Selmi R. 2000. Fin du mythe de l'autosuffisance alimentaire et place aux avantages comparatifs. *Revue Afrique Agriculture*. N° 280.Pp.30-23.
- Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 6241–6246.
- Schoch, C. L.; Seifert, K. A. *DNA barcoding in fungi*. In *Access Science*; McGraw-Hill, 2011.
- Schmitt, I.; Barker, K. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 1585–1602.
- Sharma N., Bhandari A S., 2014- Management of Pathogens of Stored Cereal Grains. 87-107.
- Simmons, G.G. (1993). *Alternaria* themes and variation (63-72). *Mycotaxon* 48, 109-140.
- Smith, D.; Ryan, M. J. *Fungal sources for new drug discovery*. In *Access Science*; McGraw-Hill Companies, 2009.
- Spormann AM (2008). *Physiology of microbes in biofilms*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 322: 17- 36.
- Tabuc, C. (2007). *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest .Spécialité : pathologie, mycologie, génétique et nutrition. 190p.
- Taylor, G, co-author of original text at IFIS Publishing, *IFIS Dictionary of Food Science and Technology*. 2^{ème} édition ,(2009) : pp 488
- Taylor, J. W.; Fisher, M. C. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, 6, 351–356.
- Taylor, J. W.; Jacobson, D. J.; Kroken, S.; Kasuga, T.; Geiser, D. M.; Hibbett, D. S.; Fisher, M. C. *Fungal Genet. Biol.* 2000, 31, 21–32.

- Timp W, Mirsaidov U, Matsudaira P, Timp G. 2009. Jamming prokaryotic cell-to-cell communications in a model biofilm. *Lab. Chip.*, 9(7):925-34.
- Touati Radia, Amor-chelihi Loubna. Isolement et Identification des Moisissures d'une Zone Aride. Mémoire de magistère Sciences Alimentaires, Université des Frères Mentouri Constantine, (2016) : 51 pp+annexes.
- Udayakumar Nithya. (2009). Safe storage Guidelines for Durum wheat. Library & Archive. Canada; 104P.
- Van der Burgt G.J.H.M., Timmermans B.G.H. (2009). *Fusarium* in wheat. Effects of soil fertility strategies and nitrogen levels on mycotoxins and seedling blight. LBL Publication.
- Van Oss CJ. 2003. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J Mol Recognit.*, 16(4):177-90.
- Vilgalys, R.; Hester, M. J. *Bacteriol.* 1990, 172, 4238–4246.
- Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.-B., Klaassen C.H.W., Perrone G. Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T., Samson R.A., 2014- Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, *Studies in Mycologie*, Vol 78 : 343- 371.
- Vogler, A.; Monaghan, M. J. *Zoolog. Syst. Evol. Res.* 2007, 45, 1– 10.
- Wang, Z.; Nilsson, R. H.; James, T. Y.; Dai, Y.; Townsend, J. P. In *Biology of Microfungi*; Springer, 2016; pp 25–46.
- Webley D.J., Jackson K. L., Mullins J.D., Hocking A.D., Pitt J.I. (1997). *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian Harvest. *Australian Journal of Agricultural Research.*, 48 (8):1249-1256.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. H.; Taylor, J. W. *PCR protocols: a guide to methods and application*. San Diego 1990, 315–322.
- Yang, Z.; Rannala, B. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 303–314.
- Yazar Selma., Omurtag Gulden Z. (2008). Fumonisin, Trichothecens and Zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 9 : 2062-2090.
- Zinafi Nassima, Hafallah Ouafa. Etude de l'activité antibiofilm d'extraits bruts de souches d'actinobactéries vis- à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de master, Université de A. MIRA - Béjaia, (2017-2018) : 30 pp+annexes.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip on the top and right, all with rounded ends and a small loop at the top right corner.

Annexes

Annexes :**Milieu MEA (Malt Extract Agar)**

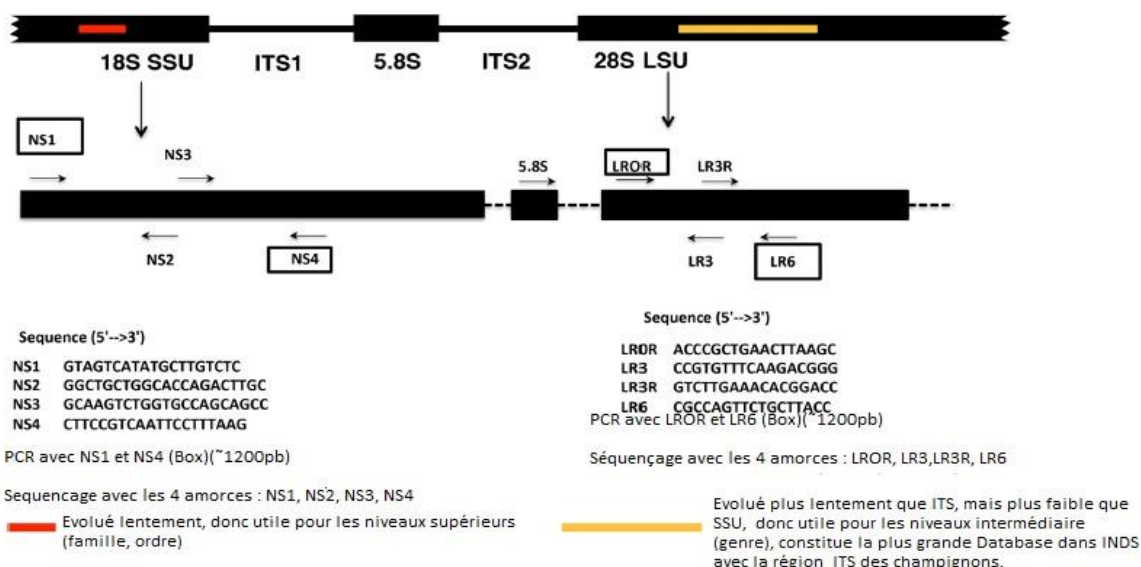
Extrait de malt	20g
Peptone	1g
Glucose	20 g
Agar	5g
Eau distillée	1000 ml

Milieu CYA (Czapeckyeast Agar)

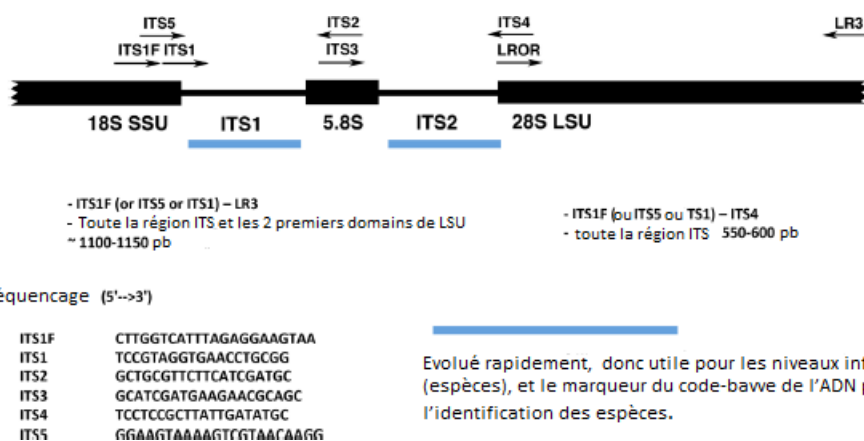
Czapeck concentré	10 ml
KH ₂ PO ₄	41g
Extrait de levure	5g
Sucrose	30 g
Agar	12 g

Milieu G25N

KH ₂ PO ₄	40.75 g
Czapek Concentré	7.5 ml
Extrait de levure	3.7 g
Glycérol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml



Annexe1 : les amorces utilisées pour l'amplification de la sous-unité SSU et LSU de l'ARNr (Huzefa et al., 2017).



Annexe2 : les amorces utilisées pour l'amplification de la région ITS (Huzefa et al., 2017).