

ملخص

تعد الحبوب الشتوية، وخاصة القمح الصلب، العنصر الأساسي للنظام الغذائي الجزائري، لما له من أهمية إستراتيجية في تغذية الإنسان و علف الحيوانات. العديد من الأمراض الفطرية بإمكانها مهاجمة محاصيل الحبوب ، بما في ذلك القمح الصلب. هذه الهجمات يمكن أن تسبب خسائر كبيرة عندما تكون الأصناف المستخدمة حساسة. بالإضافة إلى ذلك فإن هذه الفطريات الممرضة تعتبر مسؤولة أيضا عن الأمراض البشرية. ولهذا فإن اللجوء إلى استخدام المبيدات الفطرية هو أمر لا مفر منه لحماية النبات من جميع الملوثات الخارجية. تضمن أفضل حماية لنبتة القمح بواسطة نوعين من المنتجات: المبيدات الفطرية و الحشرية. فيما يخص المبيدات الفطرية، أثبتت التريازولات فعاليتها لأكثر من ثلاثين سنة. التريازولات هي مثبطات التخليق الحيوي للستيرولات. في الوقت الحالي ، أصبح للعض الفطري مقاومة للمبيدات نتيجة الاستخدام المفرط لهذه الأخيرة. آلية المقاومة الأكثر شيوعا لدى العفن الفطري هي طفرة الجين *cyp51A* الذي يرمز إلى انزيم 14- α stérol . *déméthylase* المبيدات الفطرية الأزولية تثبط هذا الإنزيم، مما يؤدي إلى تعطيل التركيب الحيوي للإرغوستيرول وبالتالي استنزاف هذا الأخير وتراكم نواتج سامة. في هذا السياق قمنا بإجراء دراسة مقارنة لعينات من بذور وأوراق وأذنين القمح الصلب المعالجة بالمبيدات الفطرية الأزولية : Raxil® 060 FS ، Amistar® Xtra وArtea®330EC وأخرى غير معالجة من أجل تقييم فعالية التريازولات و تقييم درجة حماية نبات القمح بعد العلاج بالمبيدات الفطرية في ولاية قسنطينة (الجزائر). وفقا للتحليل الميكولوجي للعينات ، تم عزل 114 سلالة. الصنفان *Aspergillus* و *Penicillium* هما الأكثر هيمنة . بعد تعريف الأصناف بالتقنية الجزيئية و تقنية مصفوفة المساعدة بالليزر و الامتزاز التائني في وقت الرحلة الكتلية الطيفية ، ستة أصناف مقاومة للعلاج بالمبيدات الفطرية تم اختيارها لدراسة تأثير هذه الأخيرة ، وهي فطر : *A. flavus* ، *A. tubingensis* ، *P. glabrum* ، *P. griseofulvum* ، *T. harzianum* و *A. alternata*. إن دراسة حساسية هذه العزلات تعنى في البداية بتقييم نشاط المبيدات الفطرية ،المذكورة سابقا، داخل المختبر بتقنية الانتشار. بالإضافة إلى ذلك ، فإن النتائج المتحصل عليها تم تأكيدها من خلال تحليل إحصائي أثبت أن المبيدات الفطرية التي تم اختبارها تتسبب في حدوث انخفاض في نمو العزلات مقارنة بالشواهد .بالإضافة إلى ذلك ، تم الكشف عن الطفرات المتسببة في المقاومة في جين *cyp51A* للعزلات السابقة الذكر بواسطة تحليل هذا الأخير. والنتائج المتحصل عليها تمت معالجتها من خلال مناهج المعلوماتية الحيوية (bioinformatiques) من أجل استغلالها.

الكلمات المفتاحية

الجين *cyp51A*، القمح الصلب، مبيدات فطرية التريازولات، المقاومة، مصفوفة المساعدة بالليزر و الامتزاز التائني في وقت الرحلة الكتلية الطيفية

Abstract

Winter cereals including wheat remain the staple food of the Algerian diet and show a strategic importance in both human and animal nutrition. Many fungal diseases may attack wheat farmings, These attacks may cause great loss when the used varieties are sensitive. The mildews are phytopathogenic But, they are eventually responsible of human pathologies. The treatment protects the plant from every external contamination. The best phytosanitary protection of wheat farmings is assured via two types of treatments; fungicidal and insecticide. The fungicides if used to destroy pathogenic fungi which attach the farmings, seeds and harvested products. Currently, the mildews are becoming resistant in the environment, because of the exercised pressure through the use of fungicides. The most common mildew's resistance mechanism is the mutation of the *cyp51* gene coding 14 α -Demethylase sterol. The azolated antifungals inhibit this enzyme, leading to blocking the biosynthesis of the ergosterol which leads to deplete the ergosterol And to an accumulation of toxic metabolites. In this context, we have conducted a comparative study both seed samples, leaves and wheat spikes: one of them is treated by the azolated fungicide of type: Raxil® 060 FS, l'Artea330EC and Amistar® Xtra while the other is kept untreated in order to evaluate the efficiency of triazoles and the degree of protection of the wheat farming after a fungicidal treatment in the province of Constantine (Algeria). According to the mycological analysis of the samples, 114 strains have been isolated; the species of *Aspergillus* and *Penicillium* genus are the most dominant. 6 species resistant against the treatments were selected for the study of fungicidal effects including (*A. flavus*, *A. tubingensis*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *T. harzianum* and *A. alternate*). The study of the sensitivity of these isolates covers firstly the evaluation of the *in vitro* activity of the pre-described fungicides via a diffusion technique. In addition, the obtained results validated with a statistical analysis revealed that the tested fungicides caused a decrease in the pycnidial Coating compared to control samples. Secondly, the detection of resistance mutations in the isolate's *cyp51* gene was accomplished through the analysis of this latter. The obtained results were treated using a bioinformatics approach in order to exploit them.

Key words: Durum wheat, Triazole fungicides, MALDI-TOF MS, Resistance, *cyp51A*.

Table des matières

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iv
Résumés.....	vi

<i>Introduction</i>	1
---------------------------	---

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: LES CEREALES	4
I.1. Généralités sur les céréales Définition.....	4
I.1.1. Les céréales dans le monde.....	4
I.1.2. Les céréales en Algérie	4
I.1.2.1. La céréaliculture	4
I.1.2.2. Les zones de production des céréales	5
I.2. Le blé dur	5
I.2.1. Biologie du blé	6
I.2.1.1 Cycle biologique	6
I.2.1.2. Les caractères morphologiques du blé.....	9
I.2.1.2.1 Le grain	9
I.2.1.2.2. L'appareil végétatif	9
I.2.1.2.3. L'appareil reproducteur	9
I.2.2. Les exigences du blé	10
I.2.2.1. Le sol.....	10
I.2.2.2. L'eau	11
I.2.2.3. La température.....	11
I.2.3. Importance de la culture du blé dur en méditerranée	12
I.2.4. Importance de la culture du blé dur en Algérie	12
I.2.5. Stockage du blé en Algérie	13
I.2.5.1. Le stockage traditionnel	13

I.2.5.2. Le stockage en sac	13
I.2.5.3. Le stockage en vrac	13
I.2. 5.4. Le stockage en silo	14
I.3. Facteurs de détérioration des céréales	14
I.3.1. Facteurs d'altération du blé	14
I.3.1.1. Altérations enzymatiques	14
I.3.1.2. Altération d'origine mécanique ou physique.....	14
I.3.1.3 Altération d'origine biologique	15
I.3.1.3.1. Les macro-organismes	15
I.3.1.3.2. Les micro-organismes	15
I.3.2. Effets néfastes des altérations	18
CHAPITRE II. LES MALADIES FONGIQUES DES CEREALES EN ALGERIE.....	19
II.1 Maladies sur feuillage.....	19
II.1.1. Les rouilles	19
II.1.1.1. Agents pathogènes.....	19
II.1.1.2. Symptômes.....	20
II.1.1.3. Développement de la maladie.....	20
II.1.2. Les septorioses	21
II.1.2.1. Agent pathogène.....	21
II.1.2.2. Symptômes.....	21
II.1.2.3. Développement de la maladie.....	22
II.1.3. Les helminthosporioses	22
II.1.3.1. Agent pathogène.....	22
II.1.3.2. Symptômes.....	23
II.1.3.3. Développement de la maladie.....	23
II.1.4. Oïdium	24
1.4.1 Agent pathogène.....	24
II.1.4.2. Symptômes.....	24

II.1.4.3. Développement de la maladie.....	24
II.2. Maladies des pourritures racinaires	25
II.2.1. Agent pathogène.....	25
II.2.2. Symptômes.....	26
II.2.3. Développement de la maladie.....	26
II.3. Maladies sur épi.....	26
II.3.1. Charbon nu du blé	26
II.3.1.1. Agent pathogène.....	26
II.3.1.2. Symptômes.....	26
II.3.1.3. Développement de la maladie.....	27
II.3.2. Carie du blé	27
II.3.2.1. Agent pathogène.....	27
II.3.2.2. Symptômes.....	27
II.3.2.3. Développement de la maladie.....	28
II.4. Lutte contre les maladies cryptogamiques.....	28
II.4.1. La Lutte biologique.....	28
II.4.2. La Lutte culturale.....	29
II.4.3. La Lutte génétique.....	29
II.4.4. La Lutte chimique.....	29
CHAPITRE III. LES FONGICIDES.....	30
III.1. Définition.....	30
III.2. Différentes familles de fongicides.....	30
III.2.1. Les fongicides de contact (surface).....	30
III.2.2. Les fongicides systémiques	31
III.2.2.1. Définitions de la systémie.....	31
III.2.2.2. Principaux fongicides systémiques.....	31
III.2.2.2.1. Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS).....	31
III.3. Mode d'action et site d'activité.....	31

III. 3.1 Les fongicides à site multiple (les multisites).....	32
III. 3.2 Les fongicides à site unique (Uni sites).....	32
III. 3.2.1 Les triazoles.....	32
III .3.2.1.1 Mode d'action.....	32
III .4 Les fongicides triazolées utilisées en agriculture Algérienne	32
III .4.1 Raxil® 060 FS.....	32
III .4.1.1 Compositions et dose d'utilisation.....	33
III .4.1.2 Mode d'action.....	33
III .4.1.3 Périodes d'utilisation.....	33
III .4.2 Artéa® 330EC (concentré émulsionnable).....	33
III .4.2.1 Compositions et dose d'utilisation.....	34
III .4.2.2 Mode d'action.....	34
III .4.2.3 Périodes d'utilisation.....	34
III .4.3 Amistar® Xtra.....	35
III .4.3.1 Compositions et dose d'utilisation.....	35
III .4.3.2 Mode d'action.....	35
III .4.3.3 Périodes d'utilisation.....	36

CHAPITRE IV. LA RESISTANCE AUX FONGICIDES TRIAZOLES.....37

IV .1 Définition.....	37
IV .2 Mécanismes de résistance aux triazolées.....	37
IV .2.1 Modification de la cible	37
IV .2.2 Surexpression de la cible.....	37
IV .2.3 Systèmes d'efflux : efflux accru (MDR).....	38

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I: ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES.....39

I.1. Matériel végétal.....	39
I.1.1. Prélèvement des échantillons	39

I.1.1.1. Semences de blé non traité.....	39
I.1.1.2. Semences de blé traité.....	39
I.1.1.3 Feuilles et épis de blé au stade fin tallage-début montaison (1er traitement au champ).....	40
I.1.1.4 Feuilles et épis de blé au stade floraison (2ème traitement au champ).....	40
I.2. Isolement des champignons phytopathogènes	40
I.2.1. Milieux d'isolement	40
I.2.1.1. Semence de blé dur.....	40
I.2.1.2. Feuilles et épis de blé dur.....	40
I.2.2. Méthodes d'isolement	41
I.2.2.1. Semence de blé dur.....	41
I.2.2.1.1. Méthode de suspension-dilution (méthode indirecte).....	41
I.2.2.1.2. Méthode du papier buvard (méthode directe).....	41
I.2.2.2. Feuilles et épis de blé dur.....	41
I.2.2.2.1. Technique directe.....	41
I.2.2.2.2. Technique de la chambre humide.....	42
I.2.3 Purification et conservation des souches isolées.....	42
I.3. Méthodes d'identification.....	43
I.3.1. Identification morphologique	43
I.3.1.1. Identification macroscopique.....	43
I.3.1.2. Identification microscopique.....	43
I.3.2. Caractérisation moléculaire des isolats.....	43
I.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique.....	44
I.3.2. 2. Amplification de l'ADN fongique (PCR Panfongique).....	45
I.3.2.3. Séquençage de l'ADN.....	45
I.3.2.4. Purification des séquences.....	45
I.3.2.5. Analyse des séquences.....	46
I.3.2.6. Comparaison des séquences avec la banque informatique.....	46
I.3.2.7. Analyse phylogénétique.....	46

I.3.2.8. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques.....	46
I.3.3. Identification par MALDI-TOF MS.....	47
I.3.3.1. Principe.....	47
I.3.3.2. Nettoyage de la cible.....	48
I.3.3.3. Préparation de la matrice.....	48
I.3.3.4. Préparation des échantillons et analyse spectrométrique.....	49
I.3.3.5. Traitement des données avec le logiciel Biotyper v2.1 (Bruker Daltonics).....	49

CHAPITRE II: DETERMINATION DU PROFIL DE RESISTANCE50

II.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la technique de diffusion.....	50
II.1.1. Préparation des souches.....	51
II.1.2. Préparation des fongicides.....	51
II.1.3. Technique de diffusion.....	51
II.2. Analyse statistique.....	52

CHAPITRE III: DETECTION DES MUTATIONS DE RESISTANCE dans le GENE *CYP51*.....53

III.1. Résistance par mutation de la cible <i>cyp51A</i>	53
III.1.1. Extraction de l'ADN fongique.....	53
III.1.2. PCR et Séquençage du <i>cyp51A</i>	54
III.1.3. Analyse des séquences.....	54

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I: ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES.....56

I.1. isolement des champignons phytopathogènes du blé	56
I.1.1. Semences du blé.....	56
I.1.2 Feuilles et épi de blé.....	60
I.2. Identification des isolats.....	62
I.2.1. Aspect macroscopique.....	63

I.2.2. Aspect microscopique.....	65
I.3. Amplification et séquençage de l'ARNr 18S avec des amorces universelles.....	67
I.4. Analyse phylogénétique.....	68
I.5. Analyse par MALDI-TOF MS.....	69
I.6. Discussion.....	70
CHAPITRE II: DETERMINATION DU PROFIL DE RESISTANCE	72
II .1. Calcul des concentrations minimales inhibitrices (CMF) par technique de diffusion.....	72
II.1.1. Le Raxil® 060 FS.....	72
II.1.2. L'Amistar® Xtra.....	77
II.1.3. L'Artéa® 330EC.....	81
II.2. Discussion.....	93
CHAPITRE III: DETECTION DES MUTATIONS DE RESISTANCE dans le GENE CYP51	96
III.1. Séquençage de <i>cyp51A</i>	96
III.2. Analyse des séquences.....	97
III.3. Discussion.....	99
DISCUSSION GENERALE	101
CONCLUSION GENERALE	106
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	108
ANNEXES	