

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش – الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH-ALGER-

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Présentée par : Sihem TOUATI -HATTAB-

Recherche sur les fusariotoxines des blés: Identification des espèces toxigènes et facteur de production des trichothécènes B chez le *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc.

agent de la fusariose de l'épi

Président	M.LOUANCHI	ENSA El Harrach	Professeur
Directeur de thèse	Z.BOUZNAD	ENSA El Harrach	Professeur
Co-Directeur de thèse	C.BARREAU	INRA Bordeaux France	Professeur
Examineur	H.BOUREGHDA	ENSA El Harrach	Professeur
Examineur	A.BENBELKACEM	INRAA Constantine	Directeur de recherche
Examineur	A.MOUSSAOUI	Université de Bechar	Professeur

Soutenance le 27 février 2018

Dédicaces

A mon très cher père, décédé il y a peu.

De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme.

Comment t'oublier? Ta bonté reste encore graver dans ma mémoire, j'imagine quelle serait ta joie aujourd'hui, j'aurais voulu que tu assistes à l'aboutissement de ces années de dur labeur,

Dieu en a décidé autrement.

En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour et mon attachement à toi.

Que dieu t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son paradis.

A ma très chère mère

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifices. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices.

Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et Bonheur.

A mon cher mari MOUNIR.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour et mon attachement à toi.

Ce travail te doit beaucoup...

Qu'il soit témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension, de privations et d'efforts communs.

A mes adorables fils ISLAM, DJAWAD, YACINE et MOSTEFA. Qui sont contents que leur maman a enfin terminé « sa thèse » !

A ma chère sœur SOUMIA et mes chers frères SAID et FETHI pour leurs encouragements et leurs aides continues avec tout mon amour et mon respect.

A ma petite sœur Azddina.

Une sœur comme on ne peut trouver nulle part ailleurs.

Puisse Allah te protéger, garder et renforcer notre fraternité. Je te souhaite tout le bonheur du monde.

A ma belle mère et mon beau père, que dieu vous accorde santé et longue vie

A mes adorables Belles sœurs Yasmine, Djazia, Amina et Selma vous avez été à mes coté pendant toutes les étapes de ce travail, je vous en suis très reconnaissantes. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection en souvenirs de notre indéfectible union qui s'est tissée au fil des jours.

A tous les membres de ma famille sans aucune exception.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une convention CMEP PHC Tassili entre l'unité de recherche MycSA INRA Bordeaux et l'ENSA d'El Harrach Alger.

Le travail d'une thèse représente des heures de travail difficile, solitaire; le milieu du laboratoire est empreint de restrictions, de règles, de rigueur dans les manipulations. Pourtant, le doctorat en soi est loin d'être dénué de vie et d'interactions humaines. Il s'agit avant tout d'un parcours très humain, un projet plein d'influences et d'entraves, de réflexions, d'évolution et de liens tissés, transformés. Cette section de remerciements est à mon avis la plus satisfaisante à écrire de toute ma thèse.

J'ai beaucoup de reconnaissance et d'admiration à témoigner d'abord à mon cher directeur de thèse le Pr BOUZNAD Zouaoui, qui est un modèle professionnel pour sa gestion calme de son temps pourtant si chargé de responsabilités importantes et bien sûr pour sa maîtrise remarquable de notre domaine, comme professeur, pédagogue et comme chercheur. Merci, pour la confiance que vous m'avez témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux, de m'avoir accompagné sur ce chemin, rempli d'embûches, de m'avoir guidé et enseigné les réflexes du bon chercheur. Vous m'avez appris à me poser les bonnes questions et à y répondre avec le maximum de rigueur. Merci encore de m'avoir montré l'exemple dans la préparation et la rédaction de mes papiers et travaux. Votre écoute, votre générosité, votre patience, votre optimisme et votre extraordinaire force de travail font de vous un exemple. Soyez assuré de mon attachement et de ma profonde gratitude.

J'exprime ma reconnaissance et mes vifs remerciements à mon co-encadrant de thèse le Dr BARREAU Christian pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Je remercie les membres du jury pour leur intérêt porté à ce travail, et tout particulièrement ; Madame LOUANCHI Mériam Professeur à l'ENSA, pour avoir présidé le jury ainsi que les examinateurs de ce travail : Mademoiselle BOUREGHDA Houda, Professeur à ENSA, Monsieur MOUSSAOUI Abdellah Professeur à l'Université de Béchar, Monsieur BEN BELKACEM.....

Je remercie vivement Monsieur Jean-Michel Savoie, directeur de l'unité MycSA et Madame Florence Richard-Forget, Directrice Adjointe de l'Equipe des Mycotoxines de Fusarium de m'avoir accueilli au sein de l'INRA. Merci Florence pour vos conseils précieux, vos encouragements, et votre sympathie tout au long de mes séjours à Bordeaux.

Je remercie très sincèrement Messieurs BEN HASSINE Amine et MOULAI Adel et BEN CHETTOUH Ahmed de leur aide précieuse, pour les analyses statistiques et la cartographie qui m'ont permis d'avancer rapidement dans mon travail , Je remercie chaleureusement Mesdemoiselles AMEUR Djamila et ZAZA Messaouda et HOUYOU Zohra pour leur intérêt permanent à mon égard et pour leur soutien sur le plan humain.

A titre plus personnel, Je remercie chaleureusement mon mari, Mounir, pour la grande patience, l'encouragement et la confiance qu'il m'a témoigné. Je tiens à le remercier surtout pour son soutien moral ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse.

Finalement je remercie ma mère pour son soutien qui m'a été bien utile durant ma thèse ainsi que ma grande sœur.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
3-ADON	3-acétyldéoxynivalénol
15-ADON	15-acétyldéoxynivalénol
ARN	Acide ribonucléique
a_w	Activité thermodynamique de l'eau
BEA	Beauvericine
CSAH	Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH)
DAD	Diode Array Detector
DCPA	Dichloran-Chloramphenicol-Peptone-Agar
DJT	Doses journalières tolérables
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DON	Déoxynivalénol
EC	European Commission
ENNS	Enniantins
ESI	Electrospray ionisation
EDTA	Ethylène diamine-tétra acétique
FHB	Fusarium head blight
FX	Fusarenone X
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA	Indice d'attaque
MON	Moniliformine
MS	Mass Spectrometry
NIV	Nivalénol
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SNA	synthetiser-nährstoffärmer-agar
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction

PDA Potato Dextrose Agar
PCRQ Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

Taq polymérase *Thermophilus aquaticus* polymérase

TCT Trichothécène
TCTA Trichothécène de type A
TCTB Trichothécène de type B
TCTC Trichothécène de type C
TCTD Trichothécène de type D
TE Tris-EDTA
TES Tris-EDTA-SD
UV Ultra Violet
ZEA zéaralénone

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	2
1. Données bibliographiques	7
1.1. Le blé	7
1.1.1. Généralités	7
1.1.2. Importance économique	8
1.1.3. Principales variétés de blé cultivées en Algérie	9
1.2. La fusarioses du blé	12
1.2.1. La fusariose de l'épi de blé	14
1.2.2. Cycle infectieux	15
1.2.3. <i>Fusarium</i> : le pathogène principale responsable de la fusariose	17
1.2.4. Outils de détection et de quantification des espèces fusariennes	18
1.2.4.1. Identification morphologique des espèces de <i>Fusarium</i>	19
1.2.4.2. Identification des <i>Fusarium</i> spp par outils moléculaire	19
1.3. Les mycotoxines produites par le genre <i>Fusarium</i>	21
1.3.1 Les trichothécènes	23
1.3.2. Toxicité	23
1.3.3. Législation	25
1.3.4. Biosynthèse des trichothécènes de type B	26
1.3.5. Rôle des TCTB dans le développement de la fusariose	29
1.4. Quelles stratégies pour lutter contre la fusariose de l'épi et diminuer l'accumulation des TCTB?	29
1.5. Importance du choix variétal pour la résistance à la fusariose et à l'accumulation de trichothécènes	31
1.5.1. Les différentes composantes de la résistance du blé à la FHB et TCTB	31
1.5.2. Rôles des acides phénoliques dans les mécanismes de résistance du blé	33

2. Matériel et Méthodes	36
2.1. Prospection et collecte des épis de blé fusariés	36
2.2. isolement et identification des champignons associés à la fusariose de l'épi.	36
2.2.1. Identification morphologique	39
2.2.2. Identification moléculaire des espèces de <i>Fusarium</i>	39
2.2.2.1. Extraction de l'ADN fongique	41
2.2.2.2. Identification des isolats de <i>Fusarium</i> par PCR avec amorces spécifiques	41
2.3. Caractérisation toxigène et chémotypage chez <i>F.culmorum</i> producteur de TCTB	
2.3.1. Analyse par PCR du potentiel toxigène des isolats de <i>F.culmorum</i>	42
2.3.2. Identification des chémotypes des isolats de <i>F.culmorum</i> par PCR-Q	44
2.3.2.1. Analyse des résultats après PCR-Q	45
2.3.3. Analyse par PCR spécifique pour la sequence du gène <i>Tri12</i>	45
2.3.4. Quantification par HPLC de la production des trichothécènes par les isolats de <i>F.culmorum</i>	46
2.3.4.1. Culture sur riz et extraction des trichothécènes	46
2.3.4.2. Quantification des TCTB et Zéaralenone (ZEA) par HPLC	47
2.4. Sensibilité des variétés de blés algériennes « introduites et autochtones » à la fusariose de l'épi et l'accumulation des toxines	49
2.4.1. Matériel fongique	49
2.4.2. Matériel végétale	49
2.4.3. Préparation de l'inoculum	50
2.4.4. Inoculation	52
2.4.5. Notation des traits de résistance de FHB	53
2.5. Evaluation de la sensibilité des variétés testées à l'accumulation de mycotoxines	53
2.6. Estimation de la biomasse fongique dans les grains de blé fusariés	53
2.6.1. Estimation de l'ergostérol au niveau des grains de blé par HPLC-UV	54
2.6.1.1. Extraction de l'ergostérol	54
2.6.1.2. Analyse de l'ergostérol par HPLC-UV	54
2.6.2. Analyse par PCR-Q avec des amorces gène-spécifiques afin de quantifier l'ADN de <i>F.culmorum</i>	54
2.6.2.1. Extraction d'ADN génomique sur matrice blé	54

2.6.2.2. Quantification de <i>F. culmorum</i> dans les grains de blé contaminés par PCR en Temps Réel	55
2.7. Extraction et dosage des acides phénoliques	57
2.7.1.Extraction des acides phénoliques liés aux parois par des liaisons esters	57
2.7.2. Analyse des acides phénoliques par HPLC-DAD	59
2.8. Quantification du DON-Glu au niveau des grains de blé	59
2.8.1. Extraction et analyse du DON-Glu par HPLC-MS/MS	59
3. Résultats et Discussion	63
3.1. CHAPITRE 1	
Recherche de la flore fusarienne responsable de la contamination de l'épi de blé en Algérie	62
3.1.1. Identification des espèces associées à la fusariose	62
3.1.2. Identification moléculaire des espèces de <i>Fusarium</i> responsables de la fusariose de l'épi	68
3.1.3. Discussion	69
3.2.CHAPITRE 2	
Potentiel toxigène et chémotypage de <i>F. culmorum</i>	73
3.2.1. Analyse par PCR du potentiel toxigène des isolats de <i>F. culmorum</i>	74
3.2.1.1. Identification du potentiel toxigène	74
3.2.1.2. Analyse des chémotypes des isolats de <i>F. culmorum</i> par PCR avec détection de fluorescence (SYBR® Green) en temps réel	74
3.2.2. Caractérisation quantitative du potentiel toxigène de <i>F. culmorum</i>	77
3.2.2.1. Analyse par PCR spécifique pour la séquence du gène <i>Tri12</i>	77
3.2.2.2. Quantification par HPLC de la production des trichothécènes et Zéaralénone par les isolats de <i>F.culmorum</i>	77
3.2.3. Discussion	79

3.3.CHAPITRE 3	
Evaluation de la sensibilité des variétés de blé à la fusariose ainsi qu'à l'accumulation de mycotoxines	84
3.3.1. Etude de la pathogénicité et l'agressivité de quatre souches de <i>F.culmorum</i> en plein champ	84
3.3.2. Corrélation entre les variables	88
3.3.3. Sensibilité des variétés de blé à la fusariose de l'épi	92
3.3.3.1.Evaluation de la sévérité des symptômes sur épis	92
3.3.3.2.Quantification de l'ADN fongique de <i>F.culmorum</i> sur grain fusariés	94
3.3.3.3 Quantification de l'ergostérol fongique contenu dans les grains	98
3.3.3.4 Accumulation des trichothécènes dans les grains	101
3.3.3.5 Quantification du DON-Glucoside	107
3.3.4. Analyse en Composantes Principales appliquée aux grains contaminés par <i>Fusarium</i>	110
3.3.5. Evaluation de la résistance du nouveau matériel génétique	110
3.3.6. Caractérisation de la composition en acides phénoliques liés des grains de blé	118
3.3.6.1 Quels sont les acides phénoliques liés présents dans nos grains?	118
3.3.7. Discussion	118
4.Conclusion	125
Références bibliographiques	129
Annexe	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Production céréalière de la campagne 2012/2013 par espèce.....	10
Figure 2: Symptômes et différents types de Fusariose.....	13
Figure 3: Cycle de vie des espèces du genre <i>Fusarium</i> et <i>Microdochium</i> responsables de la fusariose	16
Figure 4: (A) Hyphe croissant entre les cellules; (B) Multiplication abondantes dans les cellules mortes de l'hôte.....	16
Figure 5: Principales espèces fusariennes toxigènes sur blé et orge en Europe.....	22
Figure 6 : Structure chimique de cinq trichothécènes de type B.....	22
Figure 7 : Structure des régions génomiques contenant les gènes <i>Tri</i> connus.....	28
Figure 8 : Voie de biosynthèse des trichothécènes et gènes "Tri" impliqués.....	28
Figure 9: Protocole de prélèvements à réaliser pour l'observation de critères microscopiques de <i>Fusarium</i> spp. cultivé sur milieu SNA.....	38
Figure 10: <i>Sporodochia</i> visibles par diascopie sur SNA.....	38
Figure 11: Schéma d'une programmation de la PCR.....	43
Figure 12: Gradient pour l'analyse des trichothécènes B par HPLC-DAD.....	47
Figure 13: Démarche expérimentale suivie au cours de l'extraction des TCTB et ZEA à partir de farine de riz contaminée par les quatre isolats de <i>F. culmorum</i> pour l'identification des chémotypes et évaluation du potentiel toxigène des <i>Fusaria</i>	48
Figure 14: Plan de la parcelle réservée à l'inoculation en plein champ 2011/2012 et 2012/2013	51
Figure 15: Etapes des amplifications de PCR quantitative.....	56
Figure 16: Gradient pour l'analyse des acides phénoliques par HPLC-DAD.....	58
Figure 17: Représentation des champs de blé infectés par la fusariose de l'épi dans les étages bioclimatiques différents	62
Figure 18: Symptômes caractéristiques de la fusariose de l'épi.	63
Figure 19 : Aspects morphologiques et microscopiques des espèces fongiques de <i>F. avenaceum</i> ; <i>F. sporotrichoides</i> et <i>M. nivale</i> isolées à partir des épis de blé.....	66
Figure 20: Aspects morphologiques et microscopiques des espèces fongiques de <i>F. graminearum</i> ; <i>F. pseudograminearum</i> et <i>F. culmorum</i> isolées à partir des épis de blé	67

Figure 21: Produits d'amplification spécifique de <i>F. culmorum</i>	68
Figure 22: Produits d'amplification spécifique de <i>F. graminearum</i> et <i>F. pseudograminearum</i>	68
Figure 23: Produit d'amplification de <i>F. avenaceum</i>	68
Figure 24: Courbe d'amplification du gène <i>Tri12</i> chez les <i>F. culmorum</i> producteurs de 3 ADON et NIV.....	75
Figure 25: Analyse des trichothécènes par chromatographie en phase liquide (HPLC).....	78
Figure 26: Quantification des TCTB /Zea produites par les isolats de <i>F. culmorum</i>	78
Figure 27: Symptômes caractéristiques de la fusariose de l'épi. (A) et (C) attaque au niveau de quelques épillets du centre qui progresse vers le haut et le bas de l'épi; (B) Formation de <i>Sporodochie</i> orange sur épi; (D) symptômes sur des grains de blé, roses et ridés.....	86
Figure 28: Pourcentage des indices d'attaque en 2012 et 2013	93
Figure 29: Gamme étalon pour la quantification du gène <i>Tri5</i> au niveau des échantillons de farine de blé contaminés par TCTB.	96
Figure 30: ADN de quatre souches de <i>F. culmorum</i> des huit variétés testées en 2012.....	97
Figure 31: Analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC/UV) de l'ergostérol de la variété Chen's contaminée par <i>F. culmorum</i>	99
Figure 32: Biomasse fongique des quatre isolats de <i>F. culmorum</i> exprimée par la teneur en ergostérol chez les variétés de blé récoltées en 2012 et 2013.....	100
Figure 33: Teneur en TCTB chez les variétés de blé récoltée en 2012 et 2013.....	102
Figure 34: Analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC/DAD) de deux échantillons de blé "Vitron et HD1200" contaminés par <i>F. culmorum</i> producteur de DON/3ADON par chromatographie en phase liquide (HPLC/DAD).....	103
Figure 35: Dosage par chromatographie en phase liquide (HPLC/DAD) de la quantité de Niv de deux échantillons de blé "Vitron et HD1200" contaminés par <i>F. culmorum</i> producteur de NIV/FX	104
Figure 36: Analyse de l'Analyte Peak Height (cps) par HPLC-MS/MS.....	106
Figure 37: Quantité de DON-Glu en µg/g accumulée au niveau de quatre variétés de blé..	106
Figure 38: Correlation entre les variables et échantillons sur les axes définis par deux composantes F1 et F2.....	109
Figure 39: Comportement variétal différent de G4 et G9 vis à vis de <i>F. culmorum</i>	111

Figure 40: Profil chromatographique des acides phénoliques liés de la variété blé dur Chen's et la lignée G.....	114
Figure 41: Contenu en acide phénolique mesuré dans les grains.....	117
Figure 42: Repartition des variétés sur les deux axes F1 et F2 en corrélation avec les variables acides phénoliques et TCTB.....	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les derniers enregistrements de la production du blé en Qx en Algérie.....	10
Tableau 2: les amorces utilisées pour la détection des espèces fusariennes par PCR.....	21
Tableau 3: Concentrations maximales autorisées en DON dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, d'après le règlement (CE) n°1126/2007.....	26
Tableau 4: Composantes de la résistance à la fusariose de l'épi.....	32
Tableau 5: Les parcelles prospectées dans les différents étages bioclimatiques.....	36
Tableau 6: Séquences des amorces spécifiques utilisées pour l'identification des espèces.....	43
Tableau 7: Amorces et sondes utilisées pour l'identification des chémotypes producteurs de TCTB.....	44
Tableau 8: Liste des différentes variétés et lignées utilisées dans les essais en plein champ..	50
Tableau 9: Echelle de notation pour l'évaluation de la résistance aux maladies du blé et du triticale.....	52
Tableau 10: Paramètres des différentes méthodes chromatographiques utilisées au cours de l'étude.....	55
Tableau 11: Caractéristiques des composés phénoliques séparés par la méthode d'analyse HPLC.....	58
Tableau 12: Fréquences d'isolement des espèces de <i>Fusarium</i>	65
Tableau 13: Chémotypes des isolats de <i>F.culmorum</i> identifiés par PCR-Q.....	76
Tableau 14: Les caractéristiques des isolats algériens de <i>F.culmorum</i> utilisés dans les essais des inoculations artificielles.....	87
Tableau 15: Répartition des isolats en groupes homogènes selon l'analyse CMM de l'IA.....	89
Tableau 16: Répartition des isolats en groupes homogènes selon l'analyse CMM de TCTB et Erg	89

Tableau 17: Resistance de huit variétés de blé vis-à-vis des isolats de <i>F. culmorum</i> DON/ADON responsables de la fusariose de l'épi.....	90
Tableau 18: Resistance de huit variétés de blé vis-à-vis des isolats de <i>F. culmorum</i> NIV/Fx responsables de la fusariose de l'épi	91
Tableau 19: Classification des variétés testées en groupes homogènes selon Le test de Newman-Keuls en se basant sur l'indice d'attaque.....	94
Tableau 20: Evaluation des lignées de blé dur G1 et G4 en comparaison avec les variétés utilisées en Algérie.....	112
Tableau 21: Contenu en acide cinnamic dérivé de l'acide phénolique mesuré dans les grains des différentes variétés.....	115

Introduction générale



Introduction générale

Le blé (*Triticum* sp.) est la céréale à paille la plus cultivée dans le monde. Le blé tendre, *Triticum aestivum*, compte pour 90% de la production mondiale des blés. alors que le blé dur, *triticum durum*, ne représente que 5% de la production mondiale en blé dont 35% sont produits en Afrique du Nord et en Asie de l'Ouest (Hamadache, 2013).

A l'échelle mondiale, le blé est une céréale primordiale, d'un point de vue économique et en tant que denrée alimentaire pour l'homme grâce à leurs teneurs en protéines et en calories qu'elles soient assimilées directement ou transformées en protéines animales. En Algérie, le blé est encore la base de l'alimentation d'une large couche de la population. Il lui fournit 60% de ses besoins en énergie, 69% en protéines totales et 88% des protéines végétales. La consommation moyenne annuelle est estimée à 207 kg/habitant, derrière le Maroc (210 kg) et la Tunisie (232 kg) (Hamadache, 2013). Pour cette raison, il a été traditionnellement cultivé dans toutes les régions où les conditions climatiques permettent la croissance de cette céréale.

La culture de blé est soumise chaque année à des stress abiotiques et biotiques parmi lesquels lesquels une intense pression parasitaire par de nombreux agents de détérioration tels que les champignons pathogènes du genre *Fusarium* responsable de la fusariose. Nous citons comme exemples les deux maladies de *Fusarium Foot Rot* (FFR) et *Fusarium Head Blight* (FHB) ou fusariose de l'épi de blé qui ont déjà été signalées en Algérie par Boureghda et al. (2010). Plus précisément cette dernière maladie s'est imposée comme l'une des préoccupations importante des différents acteurs de la filière blé compte tenu des pertes économiques considérables liées à la diminution des rendements de récolte qu'elle génère (Parry et al., 1995 ; Xu et Berrie, 2005).

Plus grand encore, parmi les espèces du genre *Fusarium*, certaines ont la capacité à produire des mycotoxines. Ces métabolites secondaires fongiques sont de nature multiple et différentes familles sont susceptibles d'être retrouvées dans les grains de blé. Il s'agit essentiellement des trichothécènes, zéaralénone et fumonisine. En particulier les molécules constituant des trichothécènes de type B ou TCTB sont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées (3 ADON) et (15 ADON), le nivalénol (NIV) et sa forme acétylée, la fusarénone X (FX) (Balzer et al., 2004 ; Bennett et Klich, 2003 ; Sweeney et Dobson, 1999).

La contamination des grains par ces mycotoxines ajoute une dimension sanitaire au problème de la fusariose.

Ces molécules sont également stables chimiquement et thermiquement, et peuvent se retrouver dans des produits transformés destinés à l'alimentation humaine. Caractérisées par une toxicité aiguë avérée à doses élevées, ces mycotoxines seraient responsables d'une toxicité chronique à plus faible dose. Leur consommation régulière pourrait entraîner des pathologies diverses et en particulier des cancers de l'œsophage pour les fumonisines ainsi qu'un retard de la croissance et des troubles gastro-intestinaux pour les trichothécènes (Rocha *et al.*, 2005). L'espèce *F. culmorum*, majoritairement présente dans le blé en Algérie, produit des mycotoxines appelées trichothécènes de type B (Laraba *et al.*,2017).

En Europe des teneurs maximales de DON autorisées dans les aliments destinés à la consommation humaine ont été établies (EC N°1126/2007). En conséquence, les céréales excédant les limites établies ne sont pas autorisées pour la commercialisation et la consommation humaine. Actuellement en Algérie, il n'y a pas de normes ou de limites réglementaires fixant les niveaux maximales de mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale.

Par ailleurs la production de DON chez *Fusarium graminearum* joue un rôle dans la progression de la maladie d'un épillet à l'autre (Maier *et al.*, 2006) et c' est un facteur déterminant d'agressivité (Eudes *et al.*, 2001, Proctor *et al.*, 1995). D'autres rapports suggèrent que la production de DON de *F. culmorum* est aussi corrélée avec l'agressivité (Eudes *et al.*, 2001, Hestbjerg *et al.*, 2002, Miedaner *et al.*, 2000), mais la relation entre les symptômes et le contenu de DON n'est pas encore bien compris.

Par le passé, la quantification de l'ergostérol fongique permet de déterminer plus précisément la quantité fongique dans le grain (Seitz *et al.*, 1977, Schwadorf et Muller, 1989). Aujourd'hui le développement de la PCR quantitative constitue un outil fiable pour évaluer la biomasse du champignon représenté par l'ADN extrait de grains contaminés. De même les analyses de multi toxines utilisant les nouvelles technologies de l'HPLC/MS pour une quantification précise de la toxine, ont contribué à améliorer la caractérisation des niveaux de résistance des variétés de blé et à mieux comprendre aussi les facteurs qui influencent le développement et l'expression de la fusariose.

L'apport de telles connaissances est déterminant pour l'élaboration de stratégies visant à réduire le risque de contamination de céréales et les denrées alimentaires par les mycotoxines.

Il a été montré qu'un des leviers principaux pour limiter les teneurs en mycotoxines dans les grains était le choix variétal (Ponts, 2010). L'utilisation de variétés de blé résistantes à la fusariose et à l'accumulation de trichothécènes pourrait constituer une nouvelle approche pour maîtriser ce problème de fusariose et de contamination des grains par des mycotoxines (Schaafsma et Hooker 2007).

Malheureusement jusqu'à présent, il n'existe pas de telles variétés de blé résistantes à la fusariose. Cependant l'existence de sensibilités différentes à l'accumulation de mycotoxines au sein des variétés de blé dur disponibles est connue (Favre *et al.*, 2004). Cela suggère l'existence de facteurs capables de moduler l'accumulation de TCT B par inhibition de la biosynthèse (type résistance V-2) ou métabolisation des TCT B dans les variétés accumulant le moins de mycotoxines avec le type résistance V-1 tel que rapporté par Boutigny *et al.*, (2008).

L'hypothèse mentionnée précédemment que la résistance à l'accumulation de trichothécènes produits par les *Fusarium*. spp chez certains cultivars de blé dur, elle pourrait s'expliquer par une composition biochimique particulière du blé, riche en certains composés endogènes spécifiques et capables de réduire la biosynthèse des trichothécènes (Pinson-Gadai *et al.*, 2007). Plusieurs travaux suggéraient que la résistance à l'accumulation de toxines et au *Fusarium* pourrait être corrélée avec la teneur en composés phénoliques des grains de maïs à maturité (Assabgui *et al.*, 1993, Bily *et al.*, 2003, Reid *et al.*, 1992) et de blé (McKeehen *et al.*, 1999, Siranidou *et al.*, 2002). Des travaux plus récents ont montré qu'une fraction phénolique extraite de blé présentait un fort effet inhibiteur sur la biosynthèse des mycotoxines du type DON/ADON *in vitro* par *F. culmorum* (Boutigny *et al.*, 2010). Ces constatations confortent l'hypothèse d'un rôle possible des composés phénoliques dans la résistance à l'accumulation des trichothécènes chez le blé dur (Boutigny *et al.*, 2009, Boutigny *et al.*, 2008, Atanasova-Penichon *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, le but de nos recherches est i) d'isoler la flore fusarienne et toxigène présente sur les épis de blé algériens et l'identifier à l'aide d'analyses morphologiques et moléculaires, ii) analyser le potentiel toxigène des isolats et de caractériser le type de mycotoxines produites moyennant des tests chimiques et moléculaires, iii) étudier la pathogénie et l'agressivité des isolats algériens de *F. culmorum* et la sensibilité de différentes

variétés de blé tendre et de blé dur d'origine autochtone et introduite ainsi que deux nouvelles lignées de blé dur, iv) évaluer la résistance à la fusariose causée par *F. culmorum* et l'accumulation correspondante des trichothécènes dans les grains de blé et v) étudier le développement de ce champignon dans le grain par quantification de l'ergostérol, vi) enfin, évaluer les acides phénoliques dans l'ensemble des variétés et des lignées pour voir si leur contenu pourrait être lié à l'accumulation de toxines.

Les résultats de nos recherches sont présentés en trois chapitres dont le premier est consacré à la caractérisation et identification moléculaire de la flore fusarienne responsable de la contamination de l'épi de blé en Algérie. Cette analyse permettra d'identifier les espèces les plus fréquentes et les plus importantes en termes de contamination en toxines.

Le deuxième chapitre s'attachera ainsi à l'identification du potentiel toxigène d'une collection d'isolats de *F. culmorum*, en se basant sur des tests moléculaires, ensuite une analyse des chémotypes des isolats de *F. culmorum* par PCR-Q . Enfin une quantification par HPLC de la production des trichothécènes et de la zearalénone par les isolats de *F.culmorum* a été évaluée.

Le troisième chapitre s'intéresse à l'étude de la pathogénicité et l'agressivité de quatre souches de *F. culmorum* de chémotypes différents en plein champ. Les résultats obtenus seront exploités dans le but d'étudier le comportement des variétés autochtones et introduites de blé algérien ainsi que de nouvelles lignées sélectionnées à la fusariose de l'épi. Les paramètres étudiés dans ce chapitre sont: la sévérité des symptômes sur épis, l'ADN et l'ergostérol fongique de *F. culmorum* ainsi que les trichothécènes accumulés dans les grains. En complément, une quantification et définition de la nature des acides phénoliques accumulés dans les grains de blé ont été réalisées. Une discussion générale et des perspectives concluent le manuscrit.

Données bibliographiques



1. Données bibliographiques

1.1. Le blé

1.1.1. Généralités

L'évolution du blé a accompagné celle de l'homme et de l'agriculture; sa culture précède l'histoire et caractérise l'agriculture néolithique, née en Europe il y a 8.000 ans. La plus ancienne culture semble être le blé dur dans le croissant fertile de la Mésopotamie (Feillet, 1977 et Fillet, 2000). Le blé est l'une des principales ressources alimentaires de l'humanité, dans la civilisation occidentale et au Moyen-Orient, est un composant principal de l'alimentation humaine. Il a été domestiqué au Proche-Orient à partir d'une graminée sauvage il y a environ 10.000 ans (Harlan 1975; Henry et De Buyser, 2000; Feldmen 2001).

En Algérie, on admet généralement que la culture de blé dur a commencé et s'est développée au lendemain de la conquête arabe. La plupart des auteurs s'accordent pour considérer que la céréaliculture algérienne est depuis cette date et jusqu'à la colonisation, très largement dominée par le blé dur (Laumont et Erroux 1961). Le blé tendre était inconnu en Afrique du Nord avant l'arrivée des français. Le fellah qui ne cultivait que le « guemah » (blé dur) se mit à la « farnia » (Anonyme , 1949).

Le blé est une plante annuelle herbacée, monocotylédone des zones tempérés et des zones subtropicales qui appartient au genre *Triticum* de la famille des poacées. Aujourd'hui, deux espèces de blé dominent la production et sont les plus répandues dans le monde. Il s'agit du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et du blé dur (*Triticum turgidum, var. durum* L.) (Feillet, 2000). Le blé dur est généralement cultivé pour la production de semoule et la fabrication de pâtes alimentaires, alors que le blé tendre est une matière première, de base, pour la fabrication du pain, en raison de sa composition riche en gluten.

Le blé dur se distingue du blé tendre par son grain à albumen vitreux avec une amande dure et sa plus forte teneur en protéines. Le blé dur est tétraploïde avec un équipement

chromosomique $4n=28$ chromosomes alors que le blé tendre est hexaploïde, avec $6n=42$ chromosomes (Feillet, 2000).

La plus grande partie du blé dur produit dans le monde est constituée de blé de printemps; toutefois, il existe des variétés de blé dur d'hiver (qui ont besoin de vernalisation pour amorcer la transition de la phase végétative à la phase reproductrice); ces variétés ont été évaluées en vue de la production dans le Sud des États-Unis (Domnez et al., 2000).

1.1.2. Importance économique

Le blé (*Triticum sp.*) est la céréale à paille la plus cultivée dans le monde (Jean-Paule Chavret, 1977). Le blé tendre, *Triticum aestivum*, compte pour 90% de la production mondiale de blé. Le blé dur, *Triticum durum*, représente 5% de la production mondiale en blé dont 35% sont produits en Afrique du Nord et en Asie de l'Ouest (Hamadache, 2013).

La production mondiale de blé a presque triplé en l'espace de 44 ans, passant ainsi de 222 millions de tonnes en 1961 à plus de 626 millions de tonnes en 2005. Au 6 octobre 2016, les prévisions de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) établissaient la production mondiale de blé en 2016-2017 à 742 millions de tonnes et sa consommation estimée à 730,5 millions de tonnes.

(source:<https://www.planetoscope.com/cereales/191-production-mondiale-de-ble.html>).

Si l'on se réfère aux études et aux projections publiées par la FAO qui prennent en compte le développement démographique mondial, les besoins devraient encore s'accroître dans les années à venir, pour atteindre sans doute 1 milliard de tonnes de blé en 2020 (source : <http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/plan.htm>).

En Algérie, le blé est cultivé à travers l'ensemble des zones agro-écologiques, mais il est essentiellement localisé dans les régions semi-arides et même aride donc, soumis aux aléas climatiques qui pénalisent fortement les niveaux de productivité et par la même occasion la production (Boulal et al., 2007).

La production nationale céréalière de la campagne 2012/2013 était de l'ordre de 49 millions de quintaux, soit en dessous des prévisions estimées à 52 millions de Qx et des objectifs fixés à 50.723.180 Qx (Zaghouane et al., 2013) (Fig. 1).

La production céréalière algérienne a reculé en 2015-2016. Selon les chiffres cités par le Ministère de l'Agriculture, la production nationale de céréales (orge, blé tendre et dur) a chuté à 3.3 millions de Qx durant la dernière saison. Elle était de 4 millions de Qx en 2014-2015, de 3.5 millions de Qx en 2013-2014 et de 4.91 millions de tonnes en 2012-2013 (FAO 2016). La production la plus élevée pour le blé a été enregistrée en 2012 avec 34.322.310 Qx (Tabl.1) (<https://fr.actualitix.com/pays/dza/algerie-blé-production.php.A.2016>).

les disponibilités en céréales s'élevaient en 2009 à 230 kg par habitant en Algérie (87% en blé) contre 206 en Tunisie et 175 au Maroc. L'écart important entre le niveau actuel de la consommation et celui de la production nationale conduit l'Algérie à importer de grosses quantités de céréales : 11 millions de tonnes en 2011, dont 68% de blé, 29% de maïs et 3% d'orge. Le taux de couverture en blés par les importations s'établit à 74% sur la période 2005-2009, pour des besoins nationaux de 7.6 millions de Qx. Le déficit concerne beaucoup plus le blé tendre que le blé dur.

L'Algérie est donc confrontée à un problème de dépendance extérieure qui s'accompagne de lourdes factures. En conséquence, le coût des importations de céréales et dérivés a presque quadruplé depuis 2000 pour dépasser 4,2 milliards de dollars en 2011, dont 68% pour le blé (Rastoin et Benabderrazik, 2014).

Des objectifs ambitieux élaborés pour la période 2015-2019 accordent une importance accrue à la résolution d'un certain nombre de problèmes clés. Etant donné le climat aride du pays, le gouvernement espère créer 2 millions d'hectares de terres irriguées – contre 1,2 million d'hectares aujourd'hui – dont plus du quart serait réservé à la production de céréales.

1.1.3. Principales variétés de blé cultivées en Algérie

La politique agricole actuelle, vise le renforcement de la sécurité alimentaire nationale. La diversification variétale permet aux agriculteurs de choisir les variétés selon leurs besoins. La culture de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) pratiquée en Algérie, utilise un germoplasme de deux types : (i) les génotypes locaux traditionnels, caractérisés par un faible potentiel de production – ces ressources génétiques, modelées au cours des années par la pression sélective exercée par les facteurs du milieu, ont été sélectionnées par les chercheurs .

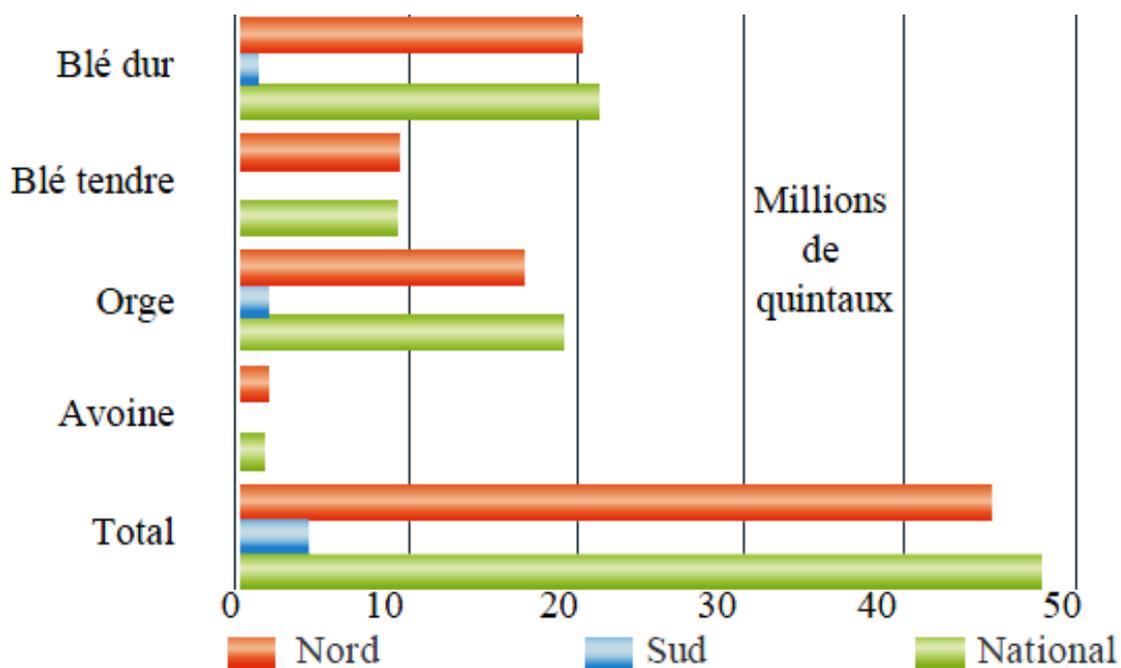


Figure 1: Production céréalière de la campagne 2012/2013 par espèce (Zaghouane, et al., 2013)

Tableau 1: Les derniers enregistrements de la production du blé en tonne en Algérie

Données	Date	Evolution
2 436 197 Tonnes	2014	≈ -862 852 ↓
3 299 049 Tonnes	2013	≈ -133 182 ↓
3 432 231 Tonnes	2012	≈ 877 305 ↑
2 554 926 Tonnes	2011	≈ -50 252 ↓

(Source): <https://fr.actualitix.com/pays/dza/algerie-ble-production.php>. A. 2016.

Au sein de cette espèce *Triticum durum*, les génotypes locaux traditionnels semblent constituer des idéotypes à nos conditions de culture (Benlaribi et Monneveux, 1988; Ali Dib et Monneveux, 1992); et (ii) les génotypes d'introduction nouvellement sélectionnés et caractérisés par un haut potentiel de production; ce matériel introduit disparaît plus rapidement à cause notamment de son inadaptation (Hazmoune, 2000).

Il reste que l'introduction de ce matériel génétique a fait régresser les variétés locales en les marginalisant pendant les années favorables, avant de disparaître à son tour après les années défavorables. Cet état de fait a rétréci la diversité des blés durs dans le pays (Boufenar-Zaghouane et Zaghouane, 2006). L'amélioration des blés tendres a suivi la même tendance que celle des blés durs.

Aussi, ce qu'il y a lieu de prendre en charge en matière de réponse appropriée à la problématique posée, c'est de s'orienter vers une considération plus conséquente des variétés locales qu'il est impératif d'améliorer (Ait Kaki, 1993). En fait, l'action d'assainissement de la gamme variétale, la publication de la liste provisoire des variétés autorisées à la production et à la commercialisation ainsi que l'établissement du zonage variétal, ont permis de réduire considérablement le nombre de variétés utilisées qui n'a pas cessé de diminuer au cours de la décennie 1992-2005 (Boufenar-Zaghouane et Zaghouane, 2006).

Ainsi en 1999, quatre-vingt-une (81) variétés de céréales étaient autorisées à la multiplication et à la commercialisation. En 2006 avec les nouvelles variétés sélectionnées, le nombre atteint 103 variétés (blé dur: 32 variétés; blé tendre: 26 variétés; orge: 23 variétés; avoine: 11 variétés; triticales: 11 variétés). Et en 2015, 139 variétés de céréales autogames sont inscrites au catalogue officiel. Douze variétés de blé dur sont actuellement en production dont cinq dites améliorées, ont été introduites depuis 1980. Les variétés Vitron et Waha sont les plus demandées sur le marché; elles occupent 65% de la superficie semencière totale. Par ailleurs, Chen's et Gta dur ont progressé ces dernières années pour atteindre respectivement 7% et 12% de la sole semencière de blé dur (Boufenar-Zaghouane et Zaghouane, 2004).

En dépit d'indéniables progrès, les rendements céréaliers demeurent faibles et très irréguliers. Ces fluctuations peuvent être dues à la variation des conditions climatiques (irrégularité des précipitations), envahissement des champs par les adventices et le développement des maladies fongiques. Ces dernières ont une influence sur le rendement

puisqu'elles contaminent pour certaines une partie de la feuille, voire la totalité (ex : la septoriose) ce qui inhibe le rendement photosynthétique. Certaines maladies affectent les épis et les grains (ex : la carie, le charbon, la fusariose). De plus, certaines espèces fongiques synthétisent des mycotoxines qui s'accumulent dans les grains, c'est le cas pour la plupart des espèces responsables de la fusariose.

1.2. La fusarioses du blé

La fusariose est une maladie fongique qui affecte de nombreuses espèces végétales à petits grains partout dans le monde (Sutton, 1982 ; Wang and Miller, 1988 ; Mesterhazy, 1995 ; Parry *et al.*, 1995 ; McMullen *et al.*, 1997 ; Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002).

La fusariose du blé est causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* et deux espèces du genre *Microdochium* (Arseniuk *et al.*, 1999). Parmi ces espèces, cinq sont principalement responsables de la fusariose, il s'agit de *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. poae* (Peck) Wollenw. et *Microdochium nivale* Samuels et Hallett (Parry *et al.*, 1995). Dans l'espèce *F. graminearum*, deux groupes se distinguent, les membres de chaque groupe sont classés en deux espèces différentes *F. pseudograminearum* "groupe 1" et *F. graminearum* "groupe 2" (Aoki et O'Donnel, 1999). Notons aussi que l'espèce *M. nivale* possède deux sous-espèces *M. nivale* var. *nivale* et *M. nivale* var. *majus* (Arseniuk *et al.*, 1999; De Hoog *et al.*, 2000 ; Simpson *et al.*, 2001; Champeil *et al.*, 2004).

Il existe plusieurs formes de fusariose pouvant affecter les différentes parties de la plante depuis les racines jusqu'à l'épi, en passant par la tige. Selon Parry *et al.*, (1995), la fusariose chez le blé se manifeste sous trois formes de maladies (Fig.2):

- "Seedling Blight" : fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fontes des semis

- "Foot Rot" : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus (FFR)
- "Head Blight" : fusariose de l'épi (FHB)

Les deux dernières Head Blight et Foot Rot (également connu sous le nom *Fusarium crown root*), sont majoritairement présentes sur le blé dans le monde (Bentley *et al.*, 2006).

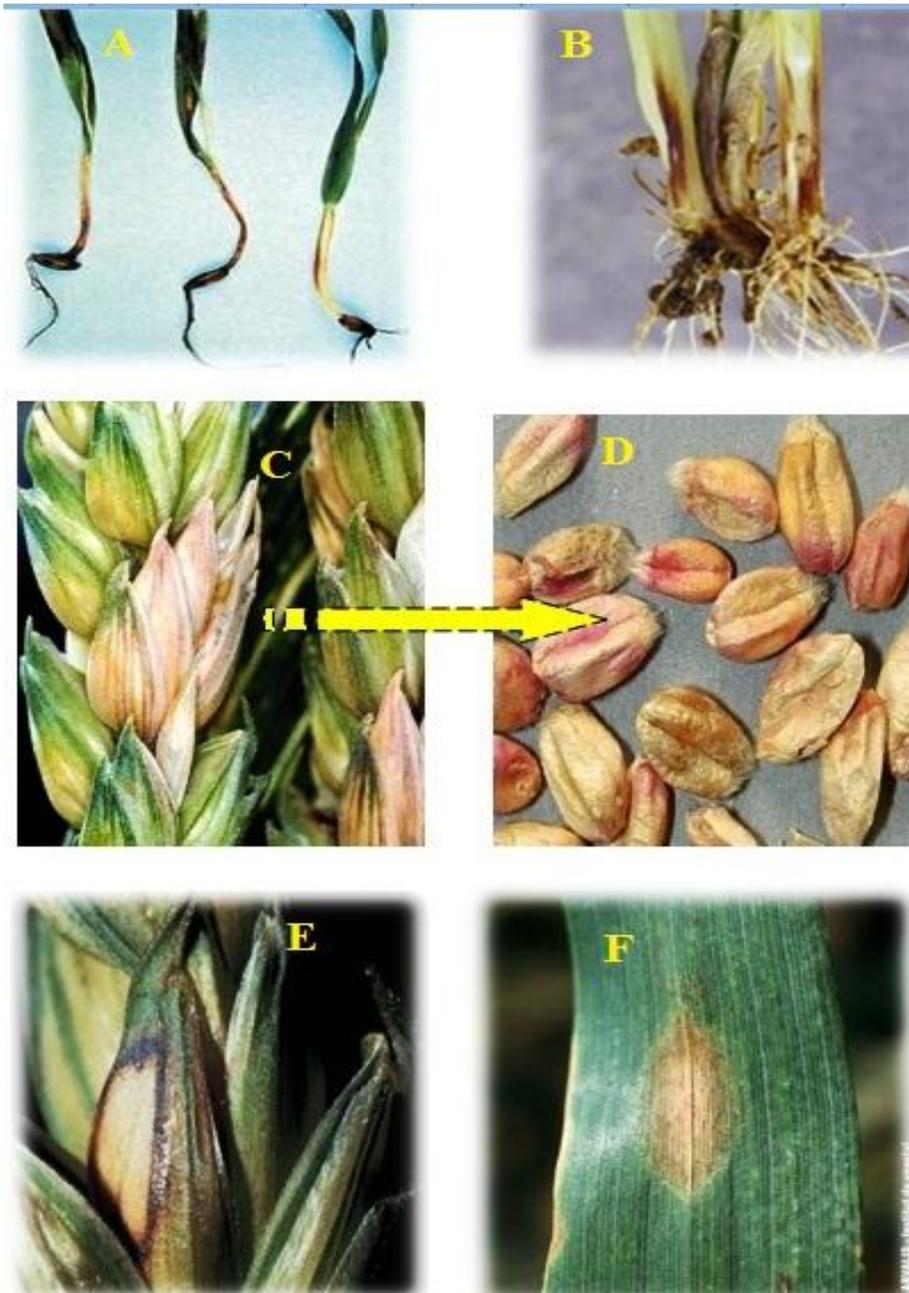


Figure 2: Symptômes et différents types de Fusariose

A: Seedling Blight; B: Foot Root; C: Head Blight; D: Grains de blé fusariés; E: Dégâts sur épis provoqués par *Microdochium* spp. ; F: Nécrose vert bouteille sur feuille causée par *Microdochium nivale*.

a,b,c,e,f:http://www.agro.basf.fr/agroportal/fr/fr/cultures/les_cereales/la_protection_phyto_du_ble/les_ts/Les_maladies.html; d: <https://www.syngenta.fr/cultures/cereales/article-protection-semences/fusariose-semences-de-ferme>.

La pourriture du collet est causée par plusieurs espèces comme *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. avenaceum* et *M. nivale* (Scherm et al., 2013).

La fusariose de l'épi est causée principalement par *F. graminearum* (téléomorphe *Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. poae* et *F. avenaceum* (Snijders, 1990 ; Boutigny, 2010). D'autres espèces, peuvent causer la maladie comme *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* et *Microdochium nivale* (anciennement *F. nivale*) (Parry et al., 1995; Xu et Berrie, 2005). Cette maladie est caractérisée par un brunissement du col de l'épi, correspondant à la progression descendante de *Fusarium* via le système vasculaire, qui est issu d'une contamination de l'épi; le *Microdochium spp.* ne produit pas ce type de symptômes. il est caractérisé par des symptômes différents, une nécrose vert bouteille de forme ovoïde irrégulière d'aspect huileux, puis évolue en une nécrose présentant souvent un aspect concentrique (Fig. 2). Le point d'insertion de la tache est le plus souvent lié à une rupture mécanique de la cuticule.

1.2.1. La fusariose de l'épi de blé (FHB)

La fusariose de l'épi s'exprime après la floraison par des épis partiellement ou complètement échaudés. Les premiers symptômes visibles sont de petites taches brunes sur les glumes; typiquement, cette fusariose envahit progressivement l'épi. Au premier stade, seuls quelques épillets sont atteints tandis que le reste de l'épi est vert (Mascher et al., 2005). La fusariose de l'épi est souvent associée à une coloration rose- orangée ou violacée au niveau des épillets qui correspond aux fructifications du champignon, surtout lors de périodes d'humidité prolongées. De petits organes de fructification noirs produits par le champignon peuvent apparaître tard dans la saison (Champeil et al., 2004, Windels, 2000). La germination des semences contaminées est également affectée, ce qui peut entraîner des symptômes de fontes de semis (Pirgozliev et al., 2003).

Sur blé, cette maladie est considérée comme un facteur majeur limitant la production dans de nombreuses parties du monde (Goswami et Kistler, 2004; Lori et al., 2009). Les répercussions économiques de cette maladie, peuvent entraîner jusqu'à 50% de perte de rendement des cultures (Parry et al., 1995 ; McMullen et al., 1997) par avortement des fleurs et une diminution du nombre et du poids des grains (Arseniuk et al. 1993). En Chine, 7 épisodes d'épidémies sévères de la fusariose de l'épi ont été recensées et ont engendré plus de 40% de pertes de rendement (Leonard et Bushnell, 2003).

D'autres épidémies ont eu lieu en Nouvelle-Zélande, au Japon et en Europe. Ces épidémies ont engendré de 40% jusqu'à 96% de pertes (Cromey *et al.*, 2001; Leonard et Bushnell, 2003; Parry *et al.*, 1995). Ces pertes de rendement sont liées aussi à une altération de la qualité des grains (Pirgozliev *et al.*, 2003). Les grains de blé fusariés sont atrophiés, ridés, décolorés et peuvent présenter un duvet blanc ou rosé (Fig. 2). La fusariose affecte également les qualités nutritives et technologiques des grains entraînant la dégradation des grains d'amidon et des parois cellulaires (Bechtel *et al.*, 1985).

En plus des pertes de production, les différentes espèces de *Fusarium* présentes sur blé peuvent conduire à la contamination des grains par diverses mycotoxines entraînant une dégradation de la *qualité sanitaire* des grains, puisque les toxines sont dangereuses pour les animaux comme pour les humains (Bottalico et Perrone, 2002 ; Waalwijk *et al.*, 2003 ; Roháček et Hudec, 2005 ; Schollenberger *et al.*, 2007).

1.2.2. Cycle infectieux

Pendant l'hiver et tout au long du cycle cultural, les agents pathogènes responsables de la fusariose des épis survivent dans le sol sous forme de chlamydospores (Bai et Shaner, 1994). L'inoculum primaire pour l'initiation de la maladie provient principalement de résidus de culture infectés l'année précédente (Champeil *et al.*, 2004 ; Osborne et Stein, 2007; Pereyra *et al.*, 2004 ; Audenaert *et al.*, 2009). Il peut également provenir de semences infectées (Xu et Nicholson, 2009) et d'adventices qui peuvent également jouer le rôle de réservoir de *Fusarium* sans présenter de symptômes visibles (Leonard et Bushnell, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004) (Fig. 3).

Au printemps, lorsque les conditions deviennent favorables, le champignon se développe et permet la formation de macroconidies mais également de périthèces et d'ascospores (Fig.3). Ces conditions sont une forte humidité (>90%) pendant 48 à 72 h en conditions contrôlées et 4 à 5 jours en conditions naturelles, et des températures comprises entre 15°C et 30°C au moment de la floraison des céréales (Bai et Shaner, 1994; Gilbert *et al.*, 2011; Doohan *et al.*, 2003). Dans le cas des espèces à reproduction sexuée les ascospores seraient vraisemblablement la source d'inoculum de l'épidémie (Caron *et al.*, 2006).

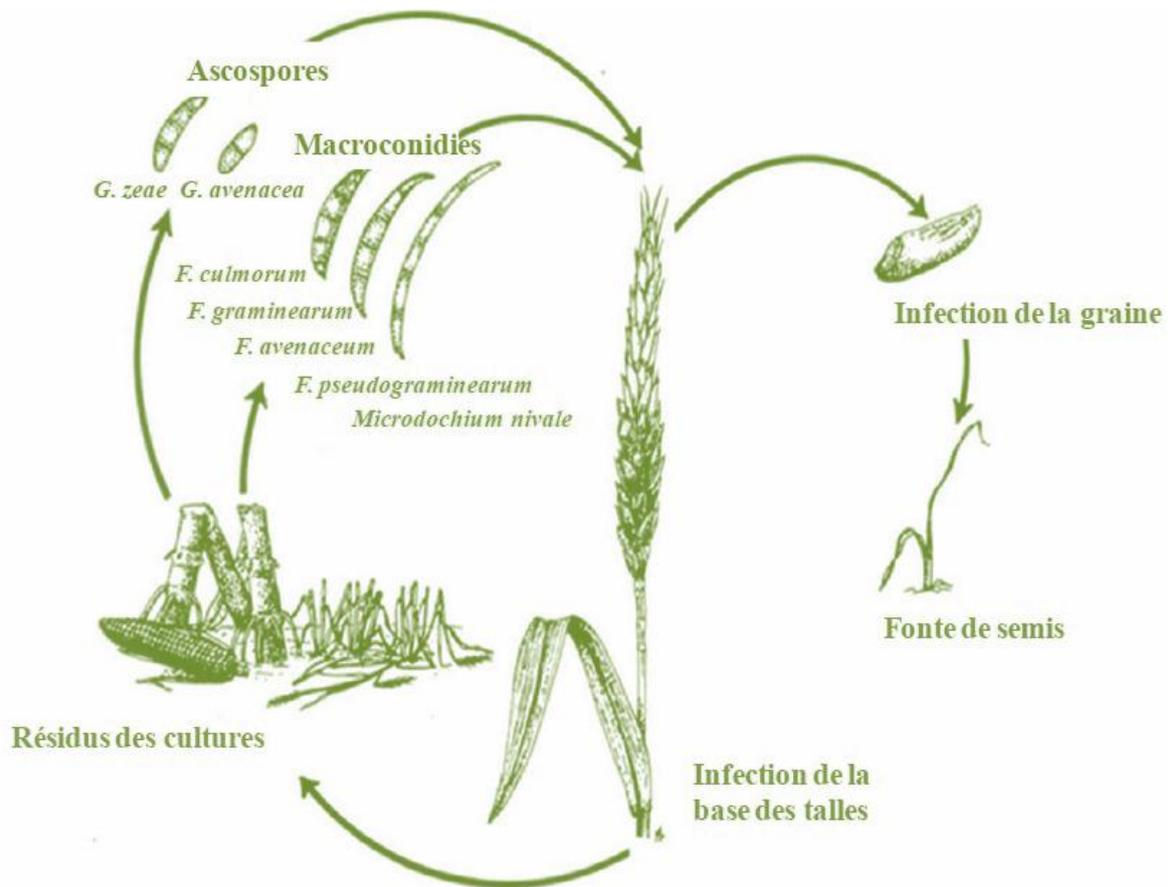


Figure 3 : Cycle de vie des espèces du genre *Fusarium* et *Microdochium* responsables de la fusariose (Parry *et al.*, 1994).

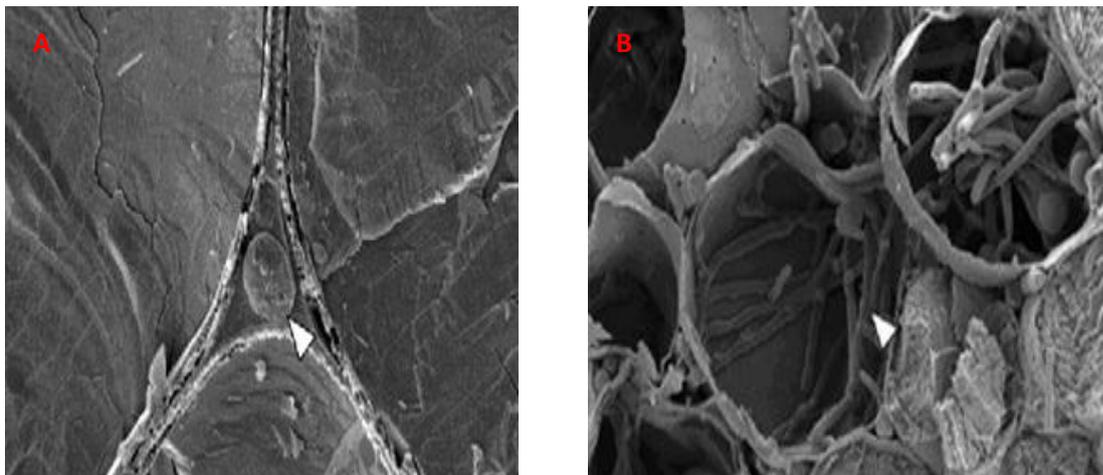


Figure 4: (A) Hyphe croissant entre les cellules; (B) Multiplication abondantes dans les cellules mortes de l'hôte (Brown *et al.*, 2010).

Les ascospores sont éjectés des périthèces puis dispersés par le vent, la pluie ou les insectes (Goswami et Kistler, 2004). Il est à noter que *F. culmorum* ne se reproduit pas par voie sexuée (Doohan *et al.*, 1999).

La fusariose de l'épi de blé est initiée par le dépôt de spores matures sur des épis de blé en fleur. Ces spores germent, colonisent les anthères extrudées, généralement dans la partie médiane de l'épi, où commence la floraison et où l'humidité est supérieure à celle des autres épillets (Walter *et al.*, 2009 ; Leonard et Bushnell, 2003). La pénétration dans l'épi peut également avoir lieu en surface des glumes ou via des ouvertures naturelles (stomates, blessures, base de l'épillet) (Brown *et al.*, 2010 ; Champeil *et al.*, 2004).

Dans un premier temps, les tubes germinatifs se développent en surface sans colonisation vasculaire (Brown *et al.*, 2010, Champeil *et al.*, 2004). Ensuite, les hyphes progressent dans les tissus vivants de l'hôte de façon radiale et induisent une colonisation intracellulaire et nécrotrophique des cellules de l'hôte (Fig. 4). L'apparition de nécrose peuvent également être associée à des tâches brunes des glumes et rachis (Christ *et al.*, 2011 ; Bottalico et Perrone, 2002). Le pathogène circule via le rachis et colonise préférentiellement les épillets adjacents et plutôt inférieurs à l'infection (Argyris *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2010, Jansen *et al.*, 2005), ce qui entraîne un échaudage de la partie supérieure de l'épi.

Les conditions climatiques ont une influence déterminante sur l'incidence de la fusariose. Une étude réalisée en Argentine par Lori *et al.* (2009), a montré que le climat est le facteur principal du développement de la maladie. Les conditions les plus propices à l'infection sont des pluies fréquentes, l'humidité élevée (92-94%), et la température supérieure à 15 °C (Mackintosh *et al.*, 2007, Parry *et al.*, 1995). La sévérité et le développement de l'infection sont largement influencés aussi par la sensibilité de la variété de blé (Heckeret *et al.*, 2004).

1.2.3. *Fusarium* : le pathogène principal responsable de la fusariose

Le genre *Fusarium* est un champignon ascomycète, qui appartient à la classe des *Sordariomycetes*, l'ordre des *Hypocreales* et la famille des *Nectriaceae*. La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809. Il doit son nom du latin *fusus* (fuseau) en rapport à la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées (Leslie *et al.* 2005).

A l'origine le classement des *Fusarium* spp. a été établi par Nelson *et al.* (1983) qui ont distingué 15 sections. Ce classement a été amendé par Burgess *et al.* (1994), puis par d'autres chercheurs grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire (Leslie et Summerell, 2006). Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* sous les genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*. Il existe quelques espèces de *Fusarium* pour lesquelles une forme sexuée n'a pas été mise en évidence. C'est le cas par exemple de *F. culmorum* appartenant à la section taxonomique *Discolor*, section à laquelle appartient également *F. graminearum* dont le téléomorphe bien identifié est *Gibberella zea* (Samuels, *et al.*, 2001, Seifert, 2001, Selosse et Durrieu, 2004, Kristensen, *et al.*, 2005). La distribution et la prédominance de ces espèces pathogènes sont, pour une grande part, déterminées par l'espèce céréalière, la région et les conditions climatiques (Xu, 2003).

En Europe, trois espèces sont principalement associées avec la fusariose de l'épi : *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. avenaceum* (Bottalico and Perrone, 2002). En France, sur plus de 700 échantillons de blé tendre, de blé dur ou d'orge analysés en 2000, *F. graminearum* a été retrouvé de manière prédominante (83.3%), suivi par *F. avenaceum* et *F. poae* (64.1% et 62.5% respectivement) (Ioos *et al.*, 2004), Aussi cette prédominance de *F. graminearum* a été confirmée dans les blés français récoltés entre 2007 et 2010 (Montibus, 2013). En Italie, les espèces prédominantes sont *F. graminearum*, suivie de *F. culmorum* et *F. avenaceum* (Bottalico et Perrone, 2002).

Dans les régions continentales comme les Etats-Unis, *F. graminearum* est l'espèce prédominante responsable des épidémies (Wilcoxon *et al.*, 1988). Dans de nombreux pays méditerranéens *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* ont été signalées comme espèces dominantes comme la Tunisie, (Kammoun *et al.*, 2010, Kammoun *et al.*, 2009), l'Algérie (Laraba *et al.*, 2017; yekkou *et al.*, 2015), la Syrie et l'Égypte (Alkadri *et al.*, 2013, Balmas *et al.*, 2015).

1.2.4. Outils de détection et de quantification des espèces fusariennes

Les méthodes microbiologiques classiques font peu à peu place à des méthodes moléculaires. De nos jours, des progrès récents en détection et quantification moléculaire de la mycoflore fusarienne peuvent permettre une analyse fine de cette communauté et des

interactions possibles, afin de limiter le développement du champignon sur la plante, la production de toxines et donc la maladie (Burlakoti *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2008). Ces nouvelles techniques ont pour but non seulement de mieux connaître les modes de vie de ces champignons toxigènes, mais aussi de lutter efficacement contre eux en mettant au point des outils de diagnostics précoces.

1.2.4.1. Identification morphologique des espèces de *Fusarium*

L'identification morphologique des espèces du genre *Fusarium* nécessite la culture des isolats sur différents milieux de cultures. Les plus utilisés sont les milieux PDA (Potato Dextrose Agar) sur lequel, les caractéristiques macroscopiques peuvent être observées (la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium aérien, la couleur de l'envers de la colonie et l'odeur), alors qu'en culture sur SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), les caractéristiques microscopiques peuvent être déterminées, telles que l'observation des macroconidies produites en *sporodochiades*, la forme des microconidies et le type des phialides portées par des conidiophores du mycélium aérien (Burgess *et al.*, 1991; LNPV, 2002).

L'instabilité cultural et morphologique est un phénomène commun chez le genre *Fusarium*. On peut distinguer différents morphotypes de l'aspect du mycélium aérien (sporodochial, duveteux, cotonneux et ras). Aussi nous observons une grande hétérogénéité de la forme des colonies, l'aspect et le nombre de septations des macroconidies, la présence ou l'absence des micro conidies, le type de phialides sur lesquelles sont produites les microconidies (monophialide et ou polyphialide) et la présence des chlamydospores et des sporodochies (Nelson *et al.*, 1983; Windels, 1991). Cependant ces techniques microbiologiques limitent l'isolement à des souches encore viables au moment de l'analyse du grain. Il est ainsi possible de ne pas isoler toutes les espèces qui ont contaminé le grain, ou encore de mal identifier certaines espèces morphologiquement semblables. Des techniques moléculaires beaucoup plus fiables basées sur la PCR ont récemment vu le jour.

1.2.4.2. Identification des *Fusarium* spp. par outils moléculaires

Elle est généralement basée sur l'amplification, par PCR (Polymerase Chain Reaction), de régions spécifiques (Hsu *et al.*, 2003). Cette technique se caractérise par sa simplicité, sa rapidité et son extrême sensibilité avec le potentiel théorique de détecter une seule molécule

cible (Edwards *et al.*, 2002). Les amorces espèce-spécifiques répertoriées dans la littérature appartenant à différentes régions génomiques, ont été synthétisées pour l'identification exacte des espèces de *Fusarium* et *Microdochium* impliquées dans la fusariose de l'épi. Ces couples d'amorces spécifiques sont représentés dans le tableau (2) .

A l'heure actuelle, il existe des outils d'identification des chémotypes (Quarta *et al.*, 2005 ; Ward *et al.*, 2002 ; Chandler *et al.*, 2003). Au laboratoire MycSa (Bordeaux) il a été testé préalablement des outils potentiels d'identification des chémotypes par PCR classique, basés sur les gènes *Tri 7* et *Tri 3* (Quarta *et al.*, 2005) et sur le gène *Tri 12* (Ward *et al.*, 2002). Récemment des amorces basées sur le gène *EF1 α* ont été exploitées par Nicolaisen *et al.* (2009) dans une étude consacrée au blé et maïs. A la description qualitative très fine permise par l'exploitation d'outils moléculaires, il était essentiel d'apporter une dimension quantitative. Les efforts de recherche s'orientent alors autour de l'exploitation de la technique "real time PCR".

La PCR en temps réel, fonctionne sur le principe de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymatique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction. Elle permet l'obtention d'une courbe d'amplification: fluorescence = f (nombre de cycle), donc en temps réel la détection de l'ADN se fait par le SYBR Green qui est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin.

Des essais d'outils de quantification existent sur les espèces de *Fusarium* (Schnerr *et al.*, 2001), en particulier basés sur le gène *Tri 5*, premier gène de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Cette approche (PCR-Q) a permis de relier les niveaux de contaminations fongiques des espèces aux données d'accumulation des toxines.

Ainsi, des corrélations positives significatives entre la quantification d'ADN de l'ensemble des producteurs de trichothécènes et les niveaux de déoxynivalénol ont été obtenues par différents auteurs (Bluhmet *al.* 2002; Schnerr *et al.* 2002 Waalwijk *et al.* 2004; Burlakoti *et al.* 2007).

Tableau 2: les amorces utilisées pour la détection des espèces fusariennes par PCR

Espèces	Amorces	Références
<i>F. graminearum</i>	Fg16F/ Fg16R	Nicholson <i>et al.</i> (1998)
	UBC85F/UBC85R	Schilling <i>et al.</i> (1996)
<i>F. pseudograminearum</i>	FP1-1/ FP1-2	Aoki et O'Donnell (1999)
	FPG-F/FPG-R	Williams <i>et al.</i> (2002)
<i>F. culmorum</i>	Fc O1F/Fc O1R	Nicholson <i>et al.</i> (1998)
	OPT 18F/ OPT 18R	Schilling <i>et al.</i> (1996)
<i>F. avenaceum</i>	AvF/AvR	Lees (1995)
	FaF/R	Doohan <i>et al.</i> (1998)
	J1AF/R	Turner <i>et al.</i> (1998)
	FA-ITSF/FA-ITSR	Schilling <i>et al.</i> (1996)
<i>F. acuminatum</i>	FAC F/ FAC R	Williams <i>et al.</i> (2002)
<i>F. equiseti</i>	FEF1/FER1	Mishra <i>et al.</i> , (2003)
<i>F. poae</i>	FP82F/ FP82R	Parry et Nicholson (1996)
<i>F. crookwellense</i>	CroA F/ CroA R	Yoder et Christianson (1998)
<i>F. oxysporum</i>	PFO3/PFO2	Edel <i>et al.</i> (2000)
<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>	Y13NF/Y13NR	Nicholson <i>et al.</i> (1998)
<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>	Mnm2F/Mnm2R	Nicholson et Parry (1996)

1.3. Les mycotoxines produites par le genre *Fusarium*

Les *Fusarium* sont connus pour leur aptitude à synthétiser une large gamme de mycotoxines regroupées sous le terme de fusariotoxines. Les plus connues appartiennent à la famille des trichothécènes produits en particulier par *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* et *F. sporotrichioides* (Bennett and Klich, 2003, Sweeney and Dobson, 1999). Mais d'autres genres fongiques tels que *Trichotecium* (d'où leur nom), *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Myrotecium*, *Cylindrocarpon* et *Verticimonosporium* en produisent (Betina, 1989; Bennett et Klich, 2003). La figure 5 illustre les différentes mycotoxines produites par les espèces de *Fusarium* (Bottalico et Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002; Waalwijk *et al.*, 2003; Ioos *et al.*, 2004; Rohacik et Hudec, 2005; Schollenberger *et al.*, 2007).

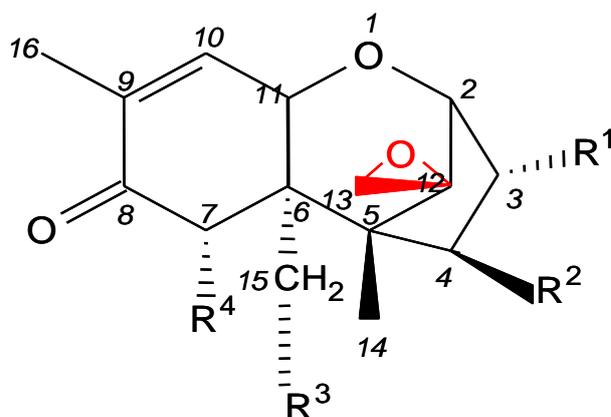
Sur blé et orge

<i>F. graminearum</i> (discolor)	TCTB, ZEA
<i>F. avenaceum</i> (roseum)	MON, BEA ENNS
<i>F. culmorum</i> (discolor)	TCTB, ZEA
<i>F. poae</i> (sporotrichiella)	TCTB (NIV)
<i>F. tricinctum</i> (sporotrichiella)	MON, BEA
<i>F. sambucinum</i> (discolor)	TCTA, ZEA BEA
<i>F. sporotrichoides</i> (sporotrichiella)	TCTA
<i>F. equiseti</i> (gibbosum)	TCTA et B, ZEA
<i>F. acuminatum</i> (gibbosum)	TCTA
<i>F. crookwellense =cerealis</i> (discolor)	TCTB, ZEA
<i>F. pseudograminearum</i> (discolor)	TCTB
<i>F. heterosporum</i> (reticulatum)	ZEA
<i>F. oxysporum</i> (elegans)	Fumonisine C
<i>F. verticilloides</i> (liseola)	Fumonisines B
<i>F. subglutinans</i> (liseola)	
<i>F. langsethiae</i> (sporotrichiella)	TCTA

TCTB Trichothécènes type B (DON, 3et 15-ADON, NIV, FX) MON: moniliformine BEA: Beauvericine

TCTA trichothécènes type A (T-2; HT-2; DAS, MAS, NEO) ZEA : Zearalenone ENNS : Enniatins

Figure 5: Principales espèces fusariennes toxigènes sur blé et orge en Europe



Trichothécènes B	R1	R2	R3	R4
Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH
3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON)	O-CO-CH3	H	OH	OH
15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON)	OH	H	O-CO-CH3	OH
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH
Fusarenone X (FX)	OH	O-CO-CH3	OH	OH

Figure 6: Structure chimique de cinq trichothécènes de type B.

1.3.1. Les trichothécènes

Les trichothécènes appartiennent au groupe des sesquiterpènes possédant un noyau tricyclique, appelé trichothécane, formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons oxygénés et quatre groupements méthyles (Balzer et *al.*, 2004, Betina, 1989). Le groupement époxyde en C12, 13 ainsi que la double liaison C9,10 confèrent la toxicité à ses métabolites secondaires (Bennett and Klich, 2003; Desjardins, et *al.* 1993).

Ueno (1985) a classé les trichothécènes en quatre groupes, en fonction de leurs structures chimiques. Les TCT C (type C) sont caractérisés par un second cycle époxyde en position C-7,8 ou C-9,10. Les TCT D (type D) incluent des trichothécènes macrocycliques qui contiennent un cycle entre les positions C-4 et C-15. Ces trichothécènes de type C et D sont produits par des champignons n'appartenant pas au genre *Fusarium* (Bennett et Klich; 2003, Sweeney et Dobson, 1999). Les TCT A (type A) ont un groupe fonctionnel autre qu'une fonction cétone en C-8 et sont représentés par la toxine T-2 et par le diacetoxyscirpenol.

Les TCT B (type B) ont une fonction cétone en C-8, et sont représentés par le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées en position C3 (3ADON) ou en position C15 (15ADON), le nivalénol (NIV) et sa forme acétylée en position C4, la fusarénone X (FX) (Balzer et *al.*, 2004, Bennett and Klich, 2003, Sweeney et Dobson, 1999) (Fig. 6). La notion de chémotype correspond au type de toxine produite si la souche est productrice de DON et ADON, elle sera dit de chémotype DON/ADON et si elle produit du NIV et des FX, elle sera de chémotype NIV/FX.

Les trichothécènes de type B incluent des molécules de faible poids moléculaire, en général compris entre 300 et 600 Da et partiellement hydrosolubles (Young and Miller 1985). Les trichothécènes sont incolores, cristallisables, stables à 120°C, relativement stables à 180°C et se décomposent en 30 minutes à 210°C. Ces molécules sont ainsi très difficiles à éliminer, une fois les grains contaminés.

1.3.2. Toxicité

Les trichothécènes sont thermostables et résistantes aux différents procédés industriels de transformation des grains. Il est donc impossible de les éliminer par des traitements simples utilisés dans l'agroalimentaire (D'Mello, *et al.*, 1999; Hazel et Patel, 2004).

Il est à noter que jusqu'à 40% de la teneur en TCT B du grain récolté peut se retrouver dans les pâtes sèches (Logrieco *et al.*, 2004). Plusieurs toxicoses que l'on soupçonne être liées à une consommation de céréales très contaminées en trichothécènes ont été décrites. Il s'agit en particulier de l'aleucie toxique alimentaire survenue en Russie à la moitié du siècle dernier (Joffe, 1983). D'autres cas similaires ont été rapportés par la suite en Chine, Inde et Japon (Eriksen, 2003). Il existe peu de données concernant les effets des trichothécènes chez l'homme. Cependant parmi les pathologies humaines liées aux toxines de *Fusarium*, nous pouvons citer les troubles hématologiques : thrombocytopénie (diminution des nombres de plaquettes sanguines), perturbation de l'hémostase (réaction anti- hémorragique), leucopénie et agranulocytose (diminution du nombre de globules blancs).

Plus généralement, les trichothécènes sont toxiques envers toutes les espèces animales testées. Leurs effets sur le système immunitaire et gastro-intestinal sont largement documentés dans la littérature (D'Mello *et al.*, 1999 ; Bennett et Klich, 2003 ; Eriksen, 2003). L'exposition à ces molécules entraîne comme symptômes un retard de croissance, une réduction des fonctions ovariennes et des désordres au niveau de la reproduction, des troubles de l'immunité, une perte d'appétence et des troubles gastro-intestinaux tels les vomissements (Pestka, 2010; Rocha *et al.*, 2005).

Le DON peut se retrouver dans les tissus 20 minutes après ingestion de la toxine, principalement dans le foie et les reins, comme chez les volailles. Chez les ruminants le transfert du DON ingéré dans le lait n'est pas significatif (AFSSA, 2009). Les trichothécènes et en particulier le DON inhibent partiellement la synthèse protéique en interférant avec la fonction de peptidyl transférase de la sous-unité 60 S du ribosome. Cette inhibition affecte l'initiation et l'élongation de la synthèse protéique (Pestka, 2010; Rocha *et al.*, 2005). A cet effet inhibiteur du DON, on peut compter aussi l'inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN, l'inhibition des fonctions mitochondriales, les effets sur la division cellulaire ainsi que l'altération de la structure des membranes (Rocha *et al.* 2005). Les TCTB peuvent également activer les mitogen-activated protein kinases (MAPKs) et induire l'apoptose (Iordanov, Pribnow *et al.* 1997; Laskin, Heck *et al.* 2002).

Les trichothécènes sont également phytotoxiques (Masuda *et al.*, 2007). A de très faibles concentrations, ils perturbent la germination des graines et entraînent le flétrissement, sur les variétés sensibles (Rocha *et al.*, 2005).

Dans beaucoup de travaux, ils ont pu montrer des différences de sensibilité aux trichothécènes (Eudes *et al.* 2000; Rocha *et al.*, 2005 Wang et Miller, 1988). Il existe des différences dans les niveaux de toxicité des TCTB. Il semble que le DON et le 15-ADON ont une toxicité équivalente, et que le 3-ADON est moins toxique que le 15-ADON. Le NIV est plus toxique et sa forme acétylée, la FX, l'est encore plus toxique (Alassane *et al.*, 2013).

1.3.3. Législation

La production des mycotoxines entraîne une dégradation de la qualité sanitaire des grains, puisque les toxines sont dangereuses pour les animaux comme pour les humains (Bakan, 1998 ; Bottalico, 1998 ; Eudes, 2000). Ces toxines sont produites dans la plupart des pays producteurs de céréales : Etats-Unis, Canada, Nouvelle-Zélande, Argentine, Pologne, Japon, Norvège, Allemagne, France (Boutigny 2007; Montibus; 2013). Chaque pays a sa propre norme de commercialisation des produits céréaliers contaminés. En revanche en Algérie, nous n'avons pas de données sur les teneurs en mycotoxines dans les aliments qui seraient règlementées.

Dans un principe de précaution, compte tenu des données attestant de la toxicité aiguë et potentiellement chronique des mycotoxines pour l'homme et la filière animale, la commission européenne a fixé des teneurs maximales autorisées pour les produits à destination de l'alimentation humaine ainsi que des recommandations pour l'alimentation animale. Les seuils réglementaires sont fixés selon les doses journalières tolérables (DJT) établies par le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH). À titre d'exemple, le consommateur doit être exposé à des doses inférieures à 1 µg/kg/j pour le DON et de 0,7 µg/kg/j pour le NIV. Ces limites sont différentes selon les toxines et l'utilisation des denrées considérées. Le règlement n°856/2005 du 6 juin 2005 révisée le 28 septembre 2007 lors de la commission n°1126/2007 autorise des teneurs maximales pour plusieurs fusariotoxines, dont les trichothécènes B, et en particulier le déoxynivalenol (Tabl. 3).

Aujourd'hui, ce qui est inquiétant est la consommation quotidienne de céréales et de produits dérivés faiblement contaminés en mycotoxines qui entraîne une forte accumulation de toxine avec le temps, ce qui constitue un risque de toxicité chronique pour le consommateur. Il existe donc sous ce problème sanitaire que sont les mycotoxines, des enjeux économiques forts de réglementation européenne sur les teneurs maximales en toxines.

Dans les années les plus défavorables, on pourrait estimer à 50% les pertes aux champs, puis à 20 % les rejets de lots de blé pour des teneurs en mycotoxines trop fortes. Considérant que les lots contaminés ne peuvent être utilisés dans l'alimentation animale ni mélangés à des lots moins contaminés, les pertes économiques de la filière céréalière pourront être lourdes.

Tableau 3 : Concentrations maximales autorisées en DON dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, d'après le règlement (CE) n°1126/2007.

Denrées	Mycotoxines	Valeur seuil en µg/kg
Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le ma	DON	1250
Blé dur et avoine brute	DON	1750
Maïs brut	DON	1750
Farine de céréales et pâtes	DON	750
Pain, pâtisseries et biscuits	DON	500
Préparations à base de céréales pour nourrissons	DON	200

La recherche s'organise donc à l'heure actuelle autour de plusieurs axes afin de limiter la fusariose de l'épi et l'accumulation de toxines au champ. Il existe plusieurs paramètres influençant l'ampleur de l'attaque de *Fusarium* et sa production de toxines (Champeil et *al.*, 2004). Parmi ces facteurs, certains tel que le climat ne sont pas maîtrisables, d'autres peuvent être de véritables leviers pour limiter les niveaux de toxines des grains récoltés ; il s'agit en particulier du facteur variétal.

1.3.4. Biosynthèse des trichothécènes de type B

Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B sont appelés « Tri ». Les chémotypes de TCT B résulteraient de différences structurales au niveau de certains gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes.

Le premier produit de la voie de biosynthèse des trichothécènes A et B est le trichodiène, synthétisé à partir du farnésyl pyrophosphate. Ce dernier, produit de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes, est lui-même le précurseur de la voie de biosynthèse des terpénoïdes et des stérols, dont l'ergostérol, composant de la paroi fongique.

La biosynthèse des trichothécènes à partir du trichodiène fait intervenir de nombreuses étapes d'oxygénation, d'isomérisation, de cyclisation et d'estérification (Desjardins, 2006; Kimura *et al.* 200). On dénombre actuellement 16 gènes *Tri* chez *F. sporotrichioides* et 15 gènes chez *F. graminearum* (le gène *Tri16* étant non fonctionnel chez *F. graminearum*). Parmi ces gènes, 12 sont regroupés en cluster dans une région de 26 kb d'ADN génomique (Hohn *et al.*, 1993 ; Brown *et al.*, 2004) (Fig.7), d'autres gènes *Tri* sont situés hors cluster. Un des locus comporte *Tri101* (McCormick *et al.*, 1999). Un autre locus comporte *Tri15* (Alexander *et al.*, 2004). Et, le dernier est composé de deux gènes *Tri*, les gènes *Tri16* et *Tri1* (Brown *et al.*, 2003 ; Meek *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 2004).

La figure 8 présente la voie de biosynthèse des TCT B. Les gènes *Tri* impliqués dans les différentes étapes de biosynthèse sont représentés sur cette voie. Le gène *Tri5* code la trichodiène synthase, une enzyme clé catalysant la première étape de la voie de biosynthèse des TCT B. Elle transforme le farnésyl pyrophosphate en trichodiène, après neuf réactions conduisant à la formation de la calonectrine (McCormick *et al.*, 2011). Une relation entre l'expression du gène *Tri5* et l'augmentation de la production de DON a déjà été observée dans des cultures de *Fusarium* (Doohan *et al.*, 1999).

Les deux chémotypes de NIV et de sa forme acétylée (FX) ainsi que le chémotype DON et ses formes acétylées (15-ADON et 3-ADON) sont déterminés génétiquement. Les produits des gènes *Tri7* et *Tri13* catalysent une oxygénation et une acétylation en C4 pour la synthèse vers le chémotype NIV, puis le produit du gène *Tri1* génère la FX. Enfin le produit du gène *Tri8* permet la formation de NIV (Lee *et al.*, 2002, McCormick *et al.*, 2011). Les gènes *Tri7* et *Tri13* ne seraient pas fonctionnels chez les producteurs de DON/ADON (Lee *et al.*, 2002). Les produits des gènes *Tri1* et *Tri8* catalysent directement la formation du 15-ADON ou du 3-ADON à partir de la calonectrine suivie par la formation du DON (McCormick *et al.*, 2011).

La fonction des gènes *Tri* sont connues maintenant. Grace à toutes ces connaissances, des études ont mis en évidence des relations entre les types de toxines produites et les séquences des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse. A titre d'exemple, en analysant la séquence des gènes *Tri3*, *7*, *8*, *12*, et *13* et leurs chémotypes, des liens ont été établis avec les toxines produites (O'Donnell *et al.*, 2008).

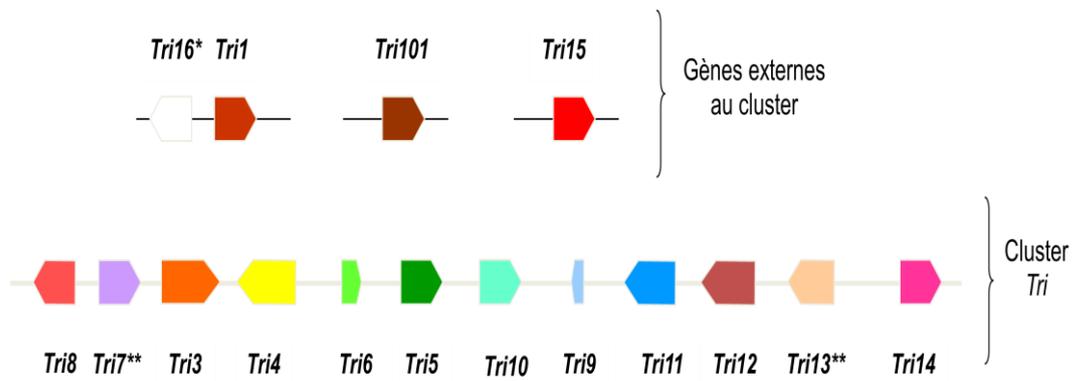


Figure 7: Structure des régions génomiques contenant les gènes *Tri* connus

Les gènes sont orientés selon leur sens de traduction. * : gène fonctionnel chez *F. sporotrichioides* mais non fonctionnel chez *F. graminearum*. ** : gènes fonctionnel chez les souches de chémotype NIV/FX exclusivement.

Source : Barreau C., communication personnelle; (Brown, McCormick et al. 2001; Kimura, Tokai et al.2003; McCormick, Harris et al. 2004)

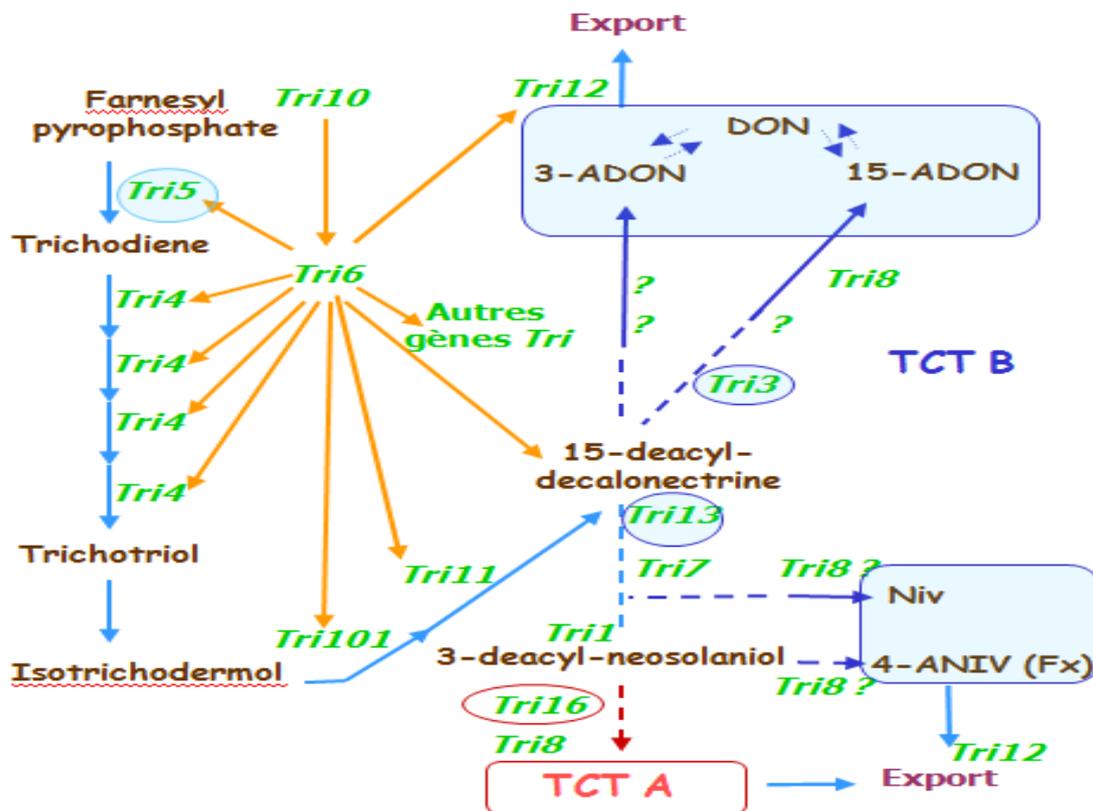


Figure 8: Voie de biosynthèse des trichothécènes et gènes "*Tri*" impliqués

(Tag et al., 2001)

Ces diverses productions rendent la classification complexe d'autant qu'une même toxine peut être produite par de nombreuses espèces de *Fusarium*, et une même espèce peut produire plusieurs types de toxines. Par exemple les souches de *F. culmorum* ne semblent produire que du 3ADON ou du NIV alors que les *F. graminearum* peuvent produire 15ADON, 3ADON ou NIV/FX (O'Donnell *et al.*, 2008 ; Pasquali *et al.*, 2010).

1.3.5. Rôle des TCTB dans le développement de la fusariose

Plusieurs études ont suggéré un rôle des mycotoxines de *Fusarium* en tant que facteurs d'agressivité *in planta* (Desjardins *et al.*, 1996 ; Desjardins et Hohn, 1997, Proctor *et al.*, 1995 ; Harris *et al.*, 1999 ; Proctor *et al.*, 2002 ; Yao *et al.*, 2005 ; Maier *et al.*, 2006). Différents niveaux de pathogénicité ont été observés chez différentes espèces de *Fusarium* et entre différentes souches au sein d'une même espèce.

Chez le blé, il est clairement montré que la production de trichothécènes n'est pas nécessaire pour l'infection initiale mais que la toxine est nécessaire pour permettre au champignon de coloniser les épillets voisins (Jansen, von Wettstein *et al.* 2005). Il a été montré que des mutants de *G. zeae* (*Tri5*), non producteurs de trichothécènes, seraient moins agressifs que les souches sauvages vis-à-vis de plantules de blé et de riz (Proctor *et al.*, 1995). De même, une souche de *F. graminearum* mutée pour le gène *Tri12* a une agressivité réduite vis-à-vis du blé (Yao *et al.*, 2005). La production de DON augmenterait l'agressivité du champignon en inhibant le mécanisme de défense de la plante et en réduisant les barrières telles que la formation de cal entre l'épillet et le rachis (Ilgen, *et al.* 2009).

Chez le genre *Fusarium*, des gènes liés à la virulence et à la pathogénicité ont été mis en évidence lors d'études sur l'interaction *F. graminearum*/hôte. Certains gènes *Tri* ou des gènes codant pour des lipases sont directement impliqués (Dyer *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2011, Proctor *et al.*, 1995). La production de DON serait un facteur clé de virulence lors de l'infection du blé par *F. graminearum* (Jansen *et al.*, 2005, Proctor *et al.*, 1995).

1.4. Quelles Stratégies pour lutter contre la fusariose de l'épi et diminuer l'accumulation des TCTB?

De nombreuses études ont mis en évidence l'impact de plusieurs facteurs environnementaux et culturaux aux champs, (Pirgozliev *et al.*, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004 ; Edwards, 2004).

Afin de diminuer les risques liés aux mycotoxines pour le blé, des outils ont été définis basés sur les données climatiques, les dates de semis et de récolte, les précédents culturaux, la gestion des résidus et le facteur variétal donnant des prévisions cohérentes entre elles (Champeil *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 1995; McMullen *et al.*, 1997). La source d'inoculum de la fusariose est multifactorielle et il est essentiel de maîtriser ces facteurs afin de limiter la densité de l'inoculum au maximum (Sutton, 1982; Parry et Jenkinson 1995; Schaafsma *et al.* 2001; Edwards, 2004; Miller, 2008).

En effet, les résidus de céréales sont plus nombreux et plus difficiles à détruire permettant à *Fusarium* de survivre dans le sol sous forme de chlamydiospore ou de mycélium saprophyte selon les espèces (Parry *et al.*, 1995). Ainsi l'enfouissement des résidus de cultures antérieures est un premier moyen de lutte contre l'incidence de la maladie, en réduisant les sources d'inoculum (Teich et Nelson, 1984 ; Champeil *et al.*, 2004). La rotation des cultures et le travail du sol sont aussi importants pour lutter contre le développement de la maladie (McMullen *et al.*, 1997). Il faut éviter que le précédent cultural soit une culture céréalière et préférer des légumineuses ou encore du colza ou du tournesol.

Divers fongicides existent, mais leur efficacité aux champs contre la fusariose et la mycotoxinogénèse est controversée (Pirzgoliev *et al.*, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004). Ainsi les fongicides de synthèse utilisées pour combattre les *Fusarium* sp et limiter la contamination en mycotoxines ne sont pas suffisamment spécifiques et sont susceptibles d'induire un déséquilibre de la population fongiques en faveur des espèces toxigènes les plus productrices en toxines. Par ailleurs, le risque sanitaire lié à l'utilisation excessive de ces fongicides n'est pas négligeable.

Un autre facteur primordial est la sensibilité variétale à l'infection. Des différences de sensibilités variétales aux fusarioses sont clairement établies (Koch *et al.*, 2006). Le choix d'une variété résistante semble être une piste intéressante (Boutigny *et al.*, 2008). Cette résistance pourrait également être reliée au contenu en composés phénoliques des grains, aussi bien pour le blé que pour le maïs (Atanasova-Penichon *et al.*, 2012, Siranidou *et al.*, 2002).

1.5. Importance du choix variétal pour la résistance à la fusariose et à l'accumulation de trichothécènes

La mise au point de variétés résistantes à la fusariose ainsi qu'à l'accumulation de mycotoxines représente la voie la plus prometteuse pour limiter le risque déoxynivalénol, bien que, jusqu'à présent, la majorité des géotypes soit assez sensibles. Il est donc nécessaire de multiplier les essais dans des conditions environnementales variées afin de sélectionner des variétés adaptées le plus largement possible ou bien alors pouvoir associer un cultivar à un type précis d'environnement.

La relation teneur en toxines/symptômes est très controversée. Plusieurs auteurs n'ont pas identifié de corrélation forte entre l'intensité des symptômes et les teneurs en DON sur blé, orge et avoine (Mirocha, et *al.* 1994; Liu et *al.* 1997). Pourtant d'autres études sur blé et maïs décrivent une relation entre symptômes visuels et teneurs en DON (Reid, Mather et *al.* 1996; Bai, Plattner et *al.* 2001; Burlakoti, et *al.* 2007). Il s'avère ainsi important d'acquérir des connaissances approfondies et fiables sur la relation entre symptômes et niveaux de toxines sur épis.

1.5.1. Les différentes composantes de la résistance du blé à la FHB et TCTB

Des différences dans l'accumulation des mycotoxines dans les plantes hôtes suggèrent une différence de leurs sensibilités vis-à-vis de *Fusarium* et certainement des mécanismes d'interférence avec les voies de toxinogénèse. Il est donc nécessaire d'identifier et de comprendre ces mécanismes afin d'incorporer la résistance à l'accumulation de toxines dans les programmes de sélection. Aujourd'hui, peu de variétés de blé sont résistantes à la fusariose. Cependant, il existe des variétés tolérantes, possédant des niveaux de résistance partiels permettant de limiter les pertes de rendements et l'accumulation des toxines dans la récolte.

La résistance à la fusariose incluant la variable toxines est une résistance à plusieurs composantes, décrite chez le blé (Miller et *al.*, 1985 ; Mesterházy, 2002). Ces composantes sont au nombre de cinq et sont résumés dans le tableau 4. En 1963, Schroeder et Christensen ont fait la distinction entre deux types de résistance à la fusariose du blé. La résistance de type I est la résistance à l'infection initiale, dont la composition du grain est déterminante dans cette composante.

Tableau 4: Composantes de la résistance à la fusariose de l'épi

Types	Composantes	Références
I	Résistance à l'infection initiale	Schroeder et Christensen, 1963
II	Résistance à la propagation du mycélium dans les tissus	Schroeder et Christensen, 1963
III	Résistance associée au maintien du nombre et de la taille des grains	Masterhazy et al., 1995
IV	Tolérance au rendement	Masterhazy et al., 1999
V	Résistance à l'accumulation de trichothécènes	Miller, 1985
V.1	Métabolisation des trichothécènes (détoxification)	Boutigny et al., 2009
V.2	Inhibition de la biosynthèse des trichothécènes	Boutigny et al., 2009

La résistance du type II est la résistance à la propagation dans l'hôte. Un des tests pour estimer la résistance de type II correspond à une inoculation par blessure sur épis et au suivi de la progression des symptômes sous le point d'inoculation. Le rôle des trichothécènes est celui de permettre à *Fusarium* de progresser plus facilement, en inhibant les défenses mises en place par la plante (Miller and Ewen 1997).

Il est difficile de discriminer le type I du type II car il n'existe pas véritablement de limite précise entre les deux. Par la suite d'autres types de résistance ont été définis en se basant sur les caractéristiques observées chez le blé résistant à la fusariose. La résistance de type III est estimée par comptage de la réduction du nombre de grains, par mesure de la diminution du poids sec ou encore de la taille des grains. La résistance de type IV se mesure en comparant le rendement obtenu par une variété en présence et en absence de symptômes de la fusariose. Enfin la résistance de type V englobe l'ensemble des mécanismes de résistance à l'accumulation de trichothécènes (Miller et al., 1985 ; Mesterházy, 2002).

La résistance de type V à la fusariose, peut être divisée en deux classes. Tout d'abord, la classe 1 correspond à la détoxification des mycotoxines par la plante. Parmi les stratégies de détoxification, la glycosylation des trichothécènes B est un processus naturel qui existe chez le blé (Boutigny et al. 2008). Ensuite, dans la classe 2, les plantes pourraient réduire l'accumulation des mycotoxines en inhibant leur biosynthèse sous l'action de composés endogènes des grains (Boutigny et al., 2009).

1.5.2. Rôles des acides phénoliques dans les mécanismes de résistance du blé

La résistance au *Fusarium* est déterminée par l'efficacité des mécanismes de défense de l'hôte activés en réponse à l'attaque du pathogène. Ces mécanismes de défense de la plante face à l'infection peuvent résulter par la modification de la paroi cellulaire.

Ainsi en réponse à l'infection, des acides phénoliques seraient synthétisés rapidement et polymérisés dans la paroi cellulaire pour la renforcer (Siranidou et al., 2002). Les acides phénoliques (tel que l'acide férulique) sont présents dans la paroi primaire des céréales (Harris et Hartley 1980). Les sons de céréales comme le maïs et le blé sont décrits comme fortement lignifiés et l'acide férulique relierait la lignine aux polysaccharides des parois cellulaires (Bunzel et al. 2004; Bily et al. 2003).

Lors de l'infection, la paroi est dégradée par le pathogène et les lysats ainsi libérés peuvent jouer le rôle d'éliciteurs des mécanismes de défense de la plante (Bily et al., 2003). L'efficacité des acides férulique et *p*-coumarique avait déjà été décrite en 1999 (McKeehen et al. 1999). Reid et al. (1992) ont montré une augmentation des teneurs en composés phénoliques dans les soies de lignées de maïs résistantes à la fusariose suite à une inoculation avec *F. graminearum*.

Plusieurs travaux ont mis en évidence une possible relation entre les teneurs en acides phénoliques des grains (acide férulique et acide *p*-coumarique) et le degré de résistance à la fusariose chez le blé (McKeehen et al. 1999; Siranidou et al. 2002). Cette relation est confirmée par les résultats de Boutigny (Boutigny , 2007) qui a observé des concentrations en acide férulique lié plus importantes dans les grains blé de la variété résistante par rapport à la variété sensible. Santiago et al., (2007) ont mis en évidence le possible rôle des dimères d'acide férulique dans la résistance à *F. graminearum* dans la tige.

Mais aussi les acides phénoliques pourraient réduire l'accumulation des mycotoxines en inhibant leur biosynthèse sous l'action de composés endogènes des grains (Boutigny, 2007). Ces acides phénoliques peuvent être solubles ou encore liés à la paroi. Il a été montré dans plusieurs études (Ponts, 2005, Ponts et al., 2006, Boutigny, 2007) l'effet modulateur des acides phénoliques chez *F. graminearum* et *F. culmorum* producteurs de trichothécènes B.

Les plantes peuvent aussi transformer chimiquement la toxine par des activités métaboliques entraînant la dégradation ou la détoxification des mycotoxines. Parmi les stratégies de détoxification, la glycosylation des trichothécènes B est un processus naturel qui existe chez le blé. Concernant leur capacité à inhiber la production de mycotoxines. Boutigny et *al.*, (2009) ont montré que, pour des concentrations inférieurs à 1 mM, l'acide férulique pouvait affecter la biosynthèse de TCTB sans pour autant modifier la croissance fongique. En cultures liquides, l'acide férulique inhibe, *in vitro*, la biosynthèse de TCTB par plusieurs souches de *F. culmorum* (Boutigny, 2007).

Matériel et Méthodes



2. Matériel et méthodes

2.1. Prospection et collecte des épis de blé fusariés

Des prospections ont été réalisées durant trois campagnes 2012, 2013 et 2014 dans les zones littorales et sublittorales des régions Nord-Centre et Nord-Est, les zones des plaines intérieures Ouest et Est; les zones des hauts plateaux Nord, Est et la zone Saharienne Sud (Tabl.5). Pour identifier les espèces responsables de la fusariose, 40 à 50 épis montrant les symptômes de la maladie ont été récoltés des parcelles prospectées. Les échantillons ont été par la suite conservés dans des sacs en papier à 4 °C jusqu'à utilisation. La date et le site de collecte ont été indiqués pour chaque échantillon.

Tableau 5: Les parcelles prospectées dans les différents étages bioclimatiques

Année	Nombre de parcelles prospectées	Zone	Wilaya
2012, 2013,2014	17	littoral et sublittoral/ Nord	Alger (Oued Smar)
2012, 2014	20	plaines intérieures/Nord	Blida,Bouira, Médéa
2012, 2013, 2014	22	Hauts plateaux	Bordj bou arréridj, Sétif,M'sila
2013, 2014	30	Plaines intérieures/ Est	Guelma, El Tarf, constantine
2014	23	Plaines intérieures/ Ouest	Relizane
2013,2014	15	Sud	El Menia
2013	10	Sud	Adrar
2012, 2013,2014	15	Sud	Laghouat (Ksar El Hiran)
2013,2014	16	Sud	Laghouat (Oued Mora)
2012, 2013,2014	20	Sud	Laghouat (Assafia)
2013,2014	8	Sud	Aflou

2.2. Isolement et identification des espèces fongiques associées à la fusariose de l'épi

Des isolements ont été réalisés à partir de fragments des épis de blé fusariés et 100 grains de chaque échantillon sont prélevés au hasard, après l'égrenage des épis à la main. Après désinfection superficielle dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 min, puis rinçage 2 fois à l'eau distillée stérile, les différents organes de l'épi et grains ainsi désinfectés ont été séchés sur papier filtre stérile.

Ils sont ensuite placés sur un milieu de culture Potato-Dextrose-Agar (Annexe1), additionné d'un antibiotique à raison de 100 µg/ mL (chloramphénicol). Les enveloppes des grains sont incubés pendant 6 à 7 jours à 25 °C dans une étuve réfrigérée, alors que les grains sont placés sur un milieu de culture Dichloran-Chloramphenicol-Peptone-Agar (DCPA, Annexe 1) (Cromey *et al.*, 2002).

Le milieu DCPA est utilisé pour la détection spécifique des *Fusarium* spp et les boîtes de pétri sont incubées pendant 10-12 jours dans une enceinte climatisée, thermostatée à 22°C (+/- 3°C) avec une photopériode d'éclairage et d'obscurité alternant toutes les 12 heures.

Pour la recherche du *Microdochium nivale* au niveau des grains, ces dernières sont placées directement sur le milieu de culture PDA. Elles sont, examinées une première fois après 6 jours d'incubation à l'obscurité dans une chambre froide à 6°C (+/- 2°C), des conditions qui favorisent le développement des *Microdochium* par rapport aux *Fusarium* spp. Ces boîtes de PDA sont ensuite incubées pendant 6 jours dans les mêmes conditions que les boîtes avec DCPA (22°C et alternance lumière/obscurité) pour favoriser la sporulation de *Microdochium*.

Le milieu DCPA étant semi sélectif, seuls les espèces du genre *Fusarium* vont se développer de manière conséquente sur le milieu (vitesse de croissance radiale >2 mm / jour et mycélium aérien abondant). Ce milieu ne permet pratiquement aucune pigmentation du thalle des champignons qui s'y développent, les cultures apparaissent donc généralement blanche à rose très pâle. De plus, il a été montré que ce milieu était significativement plus efficace que le milieu PDA pour la détection des *Fusarium* spp. (Ioos, 2001a).

Les colonies développées à partir des épis et grains et qui semblent appartenir au complexe fusarien, ont été repiquées sur un nouveau milieu PDA. Après 5 à 7 jours d'incubation à 25 °C, les différentes colonies ont été séparées en groupes selon l'aspect des colonies. Ensuite, des cultures monosporales ont été réalisées à partir de colonies représentatives de chaque groupe puis repiquées sur les deux milieux PDA et SNA, pour une éventuelle identification morphologique. Les isolats, une fois purifiés, sont conservés en tubes à essai sur le milieu PDA, ou milieu à l'extrait de malt.

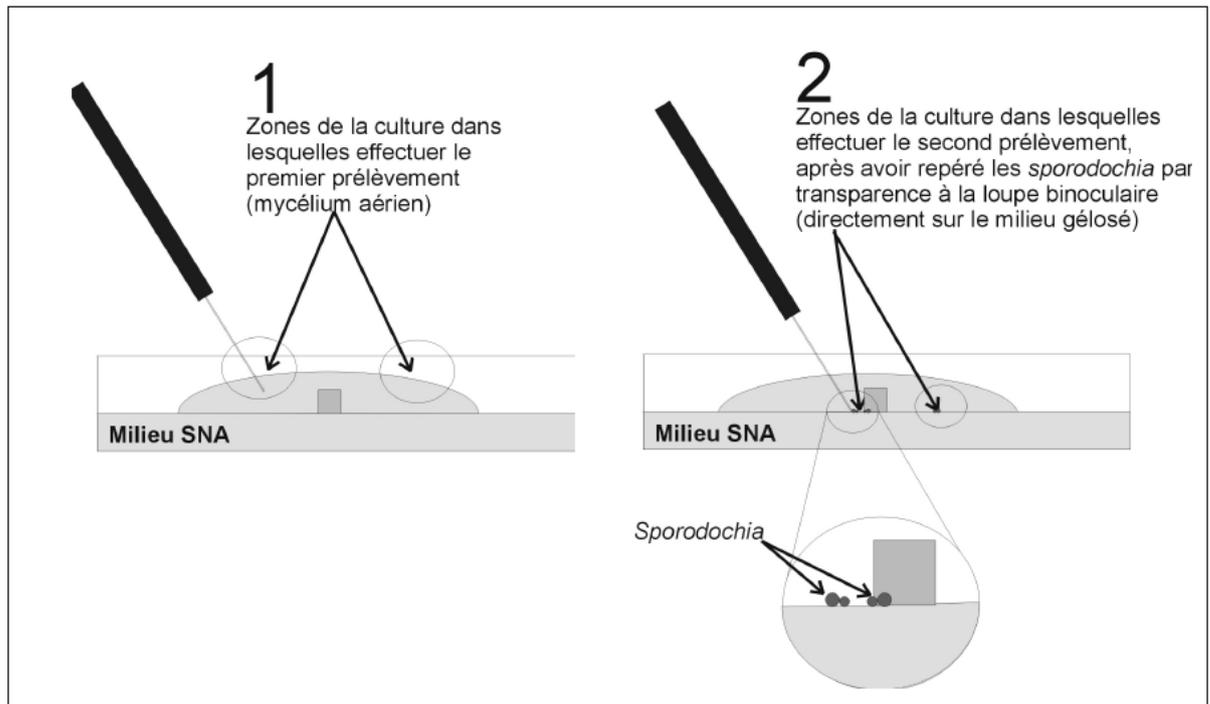


Figure 9: Protocole de prélèvements à réaliser pour l'observation de critères microscopiques de *Fusarium spp.* cultivé sur milieu SNA (LNPV, 2002)

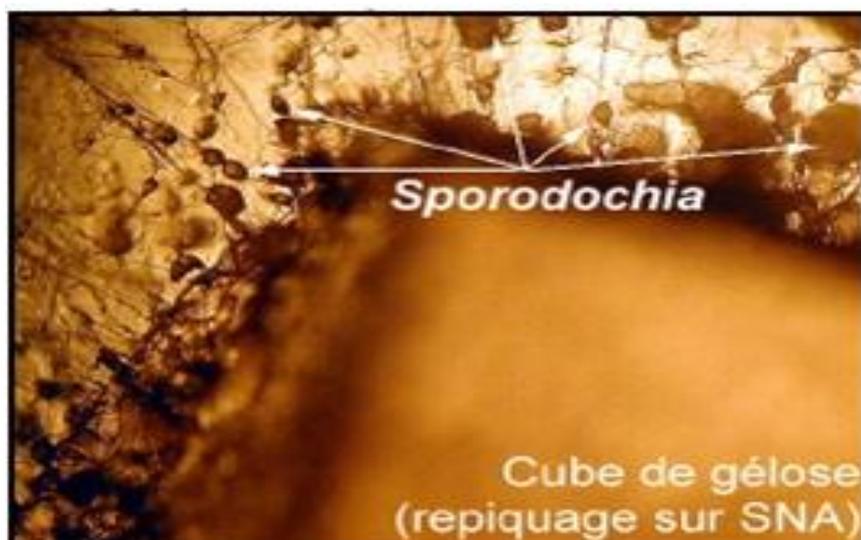


Figure 10: *Sporodochia* visibles par diascopie sur SNA (IOOS, 2001)

2.2.1. Identification morphologique

La détermination morphologique d'une espèce de *Fusarium* repose sur l'observation de nombreuses caractéristiques anamorphiques sur le milieu PDA, telles que la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium aérien, la couleur de l'envers de la colonie, l'odeur et la couleur des *sporodochia*. Avec toutes les informations l'identification pourra être réalisée en utilisant les différentes clés de références de Aoki et O'Donnell (1999), Nelson *et al.* (1983), Nirenberg *et al.* (1982) et Leslie et Summerell (2006).

Les isolats de *Microdochium nivale* sont directement identifiés sur le milieu de culture PDA. Les macroconidies de *F. culmorum* et *F. graminearum* sont directement identifiées sur le milieu DCPA (Hocking and Andrews, 1987). Les autres isolats de *Fusarium* spp. sont transférés du milieu DCPA vers un milieu PDA et un milieu SNA (synthetiser-nährstoffärmer-agar, Annexe 1) favorisant la sporulation des *Fusarium*. Après 6 à 10 jours d'incubation à 22°C, deux prélèvements pour observation sont effectués systématiquement (Fig. 9).

Le premier prélèvement consiste à récolter du mycélium aérien en plusieurs endroits de la culture, puis le transférer dans une goutte de colorant : bleu coton ou acide fuchsine pour observation au microscope, ces prélèvements permettent d'observer les microconidies produites sur le mycélium aérien. Le second prélèvement consiste à recueillir des *sporodochia* repérées, sur lesquels sont produites des macroconidies de taille et de forme relativement homogène et typique de l'espèce (Fig. 10) et (Fig. 11).

2.2.2. Identification moléculaires des espèces de *Fusarium*

Après l'identification des isolats par les critères morphologiques, au total près de 150 isolats de *Microdochium* et près de 300 isolats de *Fusarium* ont été identifiés durant les trois années de prospection. Mais seule l'identité de 60 isolats de *Fusarium* a été vérifiée par une analyse moléculaire réalisée au laboratoire INRA Bordeaux. Cette dernière a été basée sur l'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant des amorces spécifiques des principales espèces connues sur céréales.

2.2.2.1. Extraction de l'ADN fongique

Les isolats de *Fusarium* ont été cultivés sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar medium) pendant 10 jours. Le mycélium a été récupéré et immédiatement congelé puis lyophilisé. Le mycélium ainsi séché, a été broyé et réduit en poudre fine (TissueLyser® Qiagen 1min 30 Hz), avec une bille en acier. L'extraction de l'ADN a été faite selon le protocole de Möller et *al.* (1992).

A cet effet environ 5 mg de mycélium broyés sont mélangés à 600 µl de tampon de lyse TES (100 mM Tris-HCl ; pH 9 ; 10 mM EDTA ; 1% Sarcosyl SDS) et 4 µL de protéinase K puis incubés 1 à 2 heures à 65°C. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm et le surnageant est prélevé. L'ADN est extrait successivement avec 500 µL de phénol, 500 µL de phénol/chloroforme et 500 µL de chloroforme. A chaque fois, le mélange est homogénéisé par retournement, puis centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm et la phase supérieure est prélevée. 1/20^{ième} volume d'acétate de sodium 3M sont ajoutés, puis l'ADN est précipité avec 3/5^{ième} de volume d'isopropanol et centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm. Le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 70%, puis laissé à sécher au speed Vac (10 min) puis repris dans 100 µL de tampon (TE + RNase 20 µg/mL); l'ADN obtenu est stocké une nuit à 4°C. La concentration et la pureté des ADN ont été déterminées par spectrométrie (NanoDrop®) à 230, 260 et 280 nm, la pureté est évaluée par rapport aux protéines (260/280), et la pureté par rapport aux solvants utilisés (260/230). Les échantillons d'ADN ont été dilués à 20 ng/µl, dans de l'eau nucléase free et conservés à -20°C.

2.2.2.2. Identification des isolats de *Fusarium* par PCR avec amorces spécifiques

Les analyses par PCR spécifique ont été réalisées à l'aide du thermo cycleur iCycler™ thermal cycling (Bio-Rad). Les réactions de PCR ont été réalisées dans des mélanges réactionnels de 25 µL contenant pour chaque échantillons à étudier 1 µL d'ADN (correspondant à 20 ng d'ADN total) ,1X buffer PCR polymerase reaction ; 2,5 mM Mg Cl₂; 0,4 mM de chaque dNTPs; 2,5 U de Taq DNA polymerase (Promega, France) et 0,5 µM de chaque amorce.

Les amorces utilisées et leur température d'hybridation sont présentées dans le Tableau 6. Les amplifications de PCR ont été réalisées pendant 35 cycles. Les conditions de la PCR étaient définies par le programme : 95°C pendant 2 min, 35x (95°C pendant 30 s, T_m°C pendant 30 s, 72°C pendant 1 mn), 4°C à l'infini (Fig. 11). Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v) contenant 3 µL de Bromure d'éthidium ou BET à 10 mg/mL (BioRad). Le tampon utilisé est du TAE 1X (Tris Acetate EDTA). A cet effet 8 µL de produit PCR sont déposés dans les puits et la migration s'effectue à 80 V pendant environ 40 min dans la cuve d'électrophorèse. Un marqueur de taille (BenchTop 100 pb DNA Ladder, Promega) est déposé en parallèle des échantillons qui permet d'estimer la taille des fragments d'ADN. Enfin, le gel est visualisé sous lumière UV.

2.3. Caractérisation toxigène et chémotypage chez *F.culmorum* producteurs de TCTB

2.3.1. Analyse par PCR du potentiel toxigène des isolats de *F. culmorum*

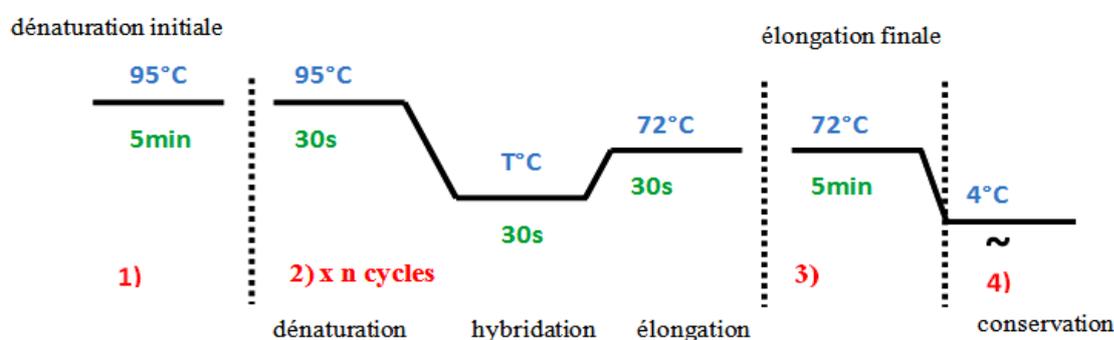
La détection du potentiel génétique de production de toxines des champignons est basée sur l'amplification de l'un des gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Le gène *Tri5* code pour une enzyme, la trichodiène synthase, catalysant la première étape de la voie de biosynthèse des trichothécènes (Hohn et Beremand, 1989; Hohn et Desjardins, 1992).

L'identification du potentiel toxigène de 40 isolats de *Fusarium culmorum* sélectionnés en se basant sur leur origine géographique a été réalisée sur l'amplification spécifique du gène *Tri5* en utilisant l'amorce Tox5 développée par Niessen et Vogel (1998). L'amorce Tox5-1(5'GCTGCTCATCACTTTGCTCAG-3') et Tox5-2(5'CTGATCTGGTCACGCTCATC-3'). L'ADN génomique des isolats a été extrait selon le protocole décrit précédemment par Möller et al. (1992). L'amplification spécifique par PCR a été réalisée dans une réaction mixte de volume 25 µl contenant 25 ng d'ADN, 10 x tampon *Taq* polymérase (10 mM Tris-HCl ; pH 7,5 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM Mg Cl₂), 200 µM de chaque dNTP, 1 µM du couple d'amorce de chaque espèce et 1,5 U de *Taq* polymérase. Le programme d'amplification étant constitué d'une dénaturation initiale de 4 min à 96 °C suivi de 5 cycles de 1 min à 96 °C, une hybridation de 2 min à 65 °C et une élongation de 2 min à 75 °C, puis de 30 cycles de 30 s à 96 °C, 30 s à 65 °C et une élongation de 1 min à 75 °C.

Tableau 6 : Séquences des amorces spécifiques utilisées pour l'identification des espèces

Espece	Amorces	Séquence 5'-3'	Tm	n	F (pb)
<i>F. culmorum</i>	FC 01F¹ FC01 R¹	ATGGTGAAGCTCGTCGTGGC CCCTTCTTACGCCAATCTCG	60°C	35	570
<i>F. graminearum</i>	Fg16NF² Fg16NR²	ACAGATGACAAGATTCAGGCACA TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA	60°C	35	280
<i>F. pseudograminearum</i>	Fp1-1³ Fp1-2³	CGGGGTAGTTTCACATTTTCYG GAGAATGTGATGASGACAATA	55°C	35	523
<i>F. avenaceum</i>	JIAf⁴ JIAr⁴	GCTAATTCTTAAGTACTAGGGGCC CGTTAATAGGTTATTTACATGGGCG	60°C	40	220
<i>F. poae</i>	Fp82F⁵ Fp82R⁵	CAAGCAAACAGGCTCTTCACC TGTTCCACCTCAGTGACAGGTT	58°C	40	250

Tm : température d'hybridation des amorces; n : nombre de cycles à appliquer; F : taille du fragment amplifié attendu en pb. 1 Nicholson et al., 1998; 2 Nicholson et al., 1998; 3 Aoki et O'Donnell (1999); 4 Turner et al., 1998 ; 5 Parry and Nicholson, 1996.



n : nombre de cycles appliqués ; T : température d'hybridation des amorces

Figure 11 : Schéma d'une programmation de la PCR.

Les bandes amplifiées ont été visualisées sous lumière UV sur gel d'agarose 1,5% (w/v). L'amplification de la région du gène *Tri5* (poids moléculaire 650 pb), indiquerait que l'isolat est potentiellement producteur de trichothécènes.

2.3.2 Identification des chémotypes des isolats de *F. culmorum* par PCR-Q

Les analyses par PCR en temps réel ont été réalisées à l'aide du système LightCycler® 2.0 et du logiciel LightCycler 4.05. L'amplification du fragment du gène *Tri12* a été évaluée dans 1 µL de chaque échantillon d'ADN (20 µg/µl) dans un volume réactionnel final de 10 µL, en utilisant le kit LightCycler® TaqMan® Master (Roche Applied Science, France). Du MgCl₂ a été supplémenté au mélange réactionnel PCR à une concentration finale de 5 mM. Les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 0.5 µM et la sonde à une concentration de 0.1µM; les amorces et sondes utilisées sont présentées dans le Tableau 7.

Les analyses ont été réalisées en triplicata dans les conditions suivantes : une pre-incubation à 95°C pendant 10 min, l'amplification est réalisée en 45 cycles de 95°C pendant 10 secondes, la température d'hybridation choisie (Tm: 65 pour la série (1) *Tri 12*-DON 3 ADON et Tm: 58 pour la série (2) *Tri 12*- NIV FX) pendant 40 secondes, 72°C pendant 1seconde, le programme se termine par un cooling à 40°C pendant 30 secondes. La fluorescence est mesurée à chaque fin de cycle. Après 45 cycles d'amplification, la courbe de dénaturation est tracée en faisant varier la température de 65°C à 95°C par paliers de 0,1°C/s avec mesure de la fluorescence à la fin de chaque palier.

Une gamme de dilution a été préparée à partir du mélange standard. Pour chaque gène, l'efficacité de la PCR (*E*) a été déterminée grâce à la gamme de dilutions comme décrit par Ponts *et al.* (2007).

Tableau 7 : Amorces et sondes utilisées pour l'identification des chémotypes producteurs de TCTB (MyCsa INRA Bordeaux)

Gène	Chémotype	Amorces	Séquences des amorces	Sondes	Séquences des sondes
<i>Tri 12</i>	3 ADON	<i>Tri12-3ADON-F</i>	GTGCCTGATGAGATGAAA	<i>Tri12-3ADON-P</i>	CCATGTACCGAATGAGGCAGTT
		<i>Tri12-3ADON-R</i>	GGGTCCAGTTTGAAGAAC		
<i>Tri 12</i>	NIV	<i>Tri12-NIV-F1</i>	GGGTATTGAATTTGTTAGC	<i>Tri12-NIV-P1</i>	AAGAAGAAGACAACTTACCACTAATGA
		<i>Tri12-NIV-R1</i>	GTCTCTCTCAACTCTATG		

2.3.2.1 Analyse des résultats après PCR quantitative

Dans la méthode de quantification absolue, l'appareil LigthCycler compare l'amplification d'un ADN cible d'un échantillon inconnu à une courbe standard préparée avec des concentrations connues de ce même ADN cible. Les courbes standard ont été générées par dilution en série d'ADN de *F. culmorum* (20 ng à 0.002 ng) (Ponts *et al.*, 2007). L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles, permettant ainsi de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction.

Pour chaque couple d'amorce l'efficacité de la PCR (E) a été déterminée en utilisant une courbe standard générée en traçant les valeurs de crossing point "Cp" (points de passage), contre les valeurs de log des facteurs de dilution de l'ADN. E est obtenue à partir de la pente de la régression linéaire: $E = 2 (10^{-1/\text{Slope}})$ avec $E_{\text{max}} = 2$ ($E = 100\%$). Les courbes standard ont été générées par dilution en série d'ADN de 20 ng/μl à 0.002 ng/μl de l'ADN de *F. culmorum* 3 Adon (INRA 268).

2.3.3. Analyse par PCR spécifique de la séquence du gène *Tri12*

Pour confirmer les chémotypes de 4 isolats de *F. culmorum* de chémotypes différents, deux isolats de *F. culmorum* potentiellement producteurs de NIV et deux autres isolats producteurs de DON obtenus de la PCR-Q, une analyse par PCR spécifique de la séquence du gène *Tri12* a été effectuée (Tabl. 7). Deux d'amorces spécifiques pour la séquence du gène *Tri 12* pour chaque chémotype ont été utilisées pour identifier les isolats de *F. culmorum* potentiellement producteurs de NIV et les isolats producteurs de DON (L. Pinson Gadais, communication personnelle).

Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur (Biometra, T-1, Göttingen, Germany) en utilisant le programme suivant pour le couple d'amorce Tri12- NivFx- F et R : dénaturation initiale de 10 min à 95 °C suivie par une amplification de 45 cycles de 10 s à 95 °C, 40 s à 58 °C et 30s à 72°C, 4°C pendant ∞. Le programme a été terminé par une extension finale de 5 min à 72 °C. Pour identifier les isolats producteurs de DON, les amorces Tri12-DON-3Adon-F et R ont été pré-incubées avec un seule cycle à 94°C pendant 10 min suivie par une amplification de 45 cycles de 10s à 95°C, 40s à 65°C et 30s à 72°C et terminée par une extension finale de 5 min à 72°C, 4°C pendant ∞. Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v).

2.3.4. Quantification par HPLC de la production des trichothécènes par les isolats de *F. culmorum*

2.3.4.1. Culture sur riz et extraction des trichothécènes

Le riz a été utilisé pour quantifier les teneurs en trichothécènes de type B (TCTB) produites par 4 isolats de *F. culmorum*. Au préalable le riz utilisé comme substrat a été vérifié qu'ils ne contenait aucune trace de TCTB (NIV, DON, fusarenon X (FX), 15-ADON et 3-ADON) détectables. Avant inoculation, le riz a été humidifié avec de l'eau distillée stérile et l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) des grains a été ajustée entre 0,98 et 1,00. Puis, 110 g de grains ont été distribués dans des Erlenmeyer de 500 mL, puis stérilisés deux fois par autoclavage à 110 °C pendant 25 min comme décrit par Bakan *et al.* (2001) (Fig. 13).

Les isolats de *F. culmorum* ont été repiqués dans des tubes PDA inclinés et incubés pendant 9 jours à 25 °C à l'obscurité. Les suspensions de spores requises pour inoculer le riz ont été obtenues en ajoutant de 6 mL d'eau distillée stérile par tube suivi par une agitation modérée. Le volume nécessaire d'inoculum a été ajouté stérilement de façon à obtenir une concentration finale de 10^4 spores/mL par comptage sur cellule de Thoma. Enfin, chaque Erlenmeyer a été inoculé par 0,5 mL d'une suspension sporale, et placé à l'obscurité à 25 °C.

Trois répétitions ont été préparées pour chaque isolat testé. Après 3 semaines d'incubation, les milieux de cultures ont été séchés à 75 °C pendant 48 h, puis broyés afin d'obtenir une poudre fine.

Pour l'analyse, des fractions de 5 g de chaque échantillon broyé, ont été extraites par 20 mL d'un mélange acetonitrile: eau (84/16 ; v/v), puis mises en agitation pendant 1 heure suivie d'une centrifugation; 3 ml de filtrat ont été purifiés par des colonnes *clean up* spécifique "Trichothecene P columns" (R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

Ensuite 3 mL de la phase organique ont été évaporés à sec sous flux d'azote sur un bloc chauffant (50 °C). Les échantillons ont été conservés à -20°C pour l'analyse ultérieure à l'HPLC.

2.3.4.2. Quantification des TCTB et zéaralenone (ZEA) par HPLC-DAD

Les extraits secs ont été repris dans 100 μL d'un mélange méthanol/eau (1/1 ; v/v) (Methanol Fisher Scientific, Waltham, USA), et filtrés à travers des Millipores filter de 0.45 μm . Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC Hewlett-Packard Chem Station Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diode (DAD) (Agilent, Waldbronn, Germany). Les TCTB ont été séparés le long d'une colonne KINETEX 2.6U XB-C18 (4.6 \times 150 mm) maintenue à 45 °C.

La phase mobile était constituée d'acétonitrile (solvant B), en mélange avec de l'eau MilliQ® dégazée et acidifiée à un pH 2,6 avec de l'acide o-phosphorique (solvant A). Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 45 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 5-30% B en 14 min, 30-90% B en 10 min, 90% B pendant 5 min, 90-5% B en 2 min puis 5% B pendant 14 min (Fig.12). Le volume d'injection est de 5 μL . Les surfaces des pics sont mesurées à 230 nm. L'identification des différents TCT B se fait grâce à leur temps de rétention et leurs spectres UV mesuré de 190 à 360 nm. La quantification des 5 TCT B est réalisée par étalonnage externe. L'étalonnage externe utilise des composés de référence achetés sous forme de poudre lyophilisée chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA) .

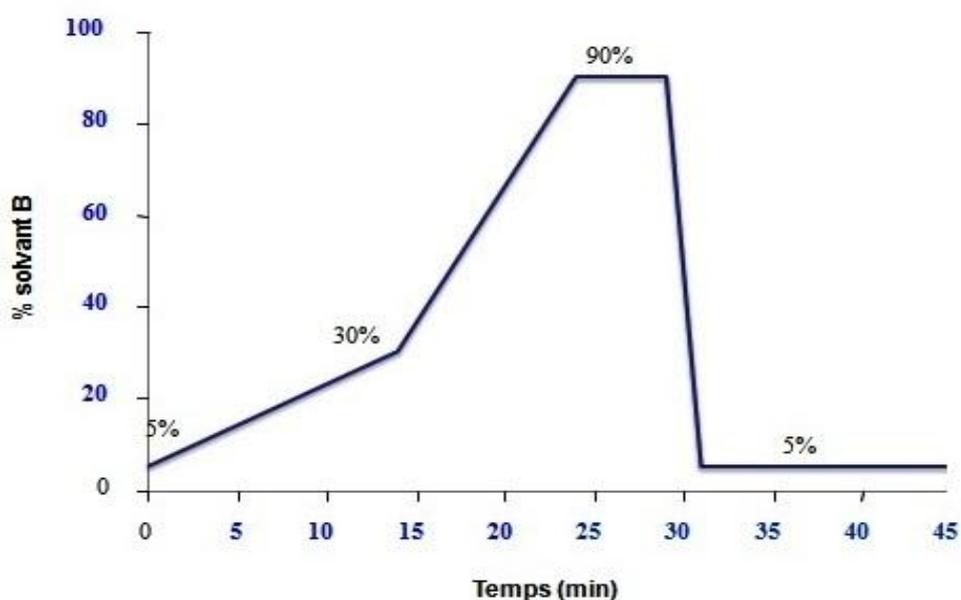


Figure 12: Gradient pour l'analyse des trichothécènes B par HPLC-DAD.

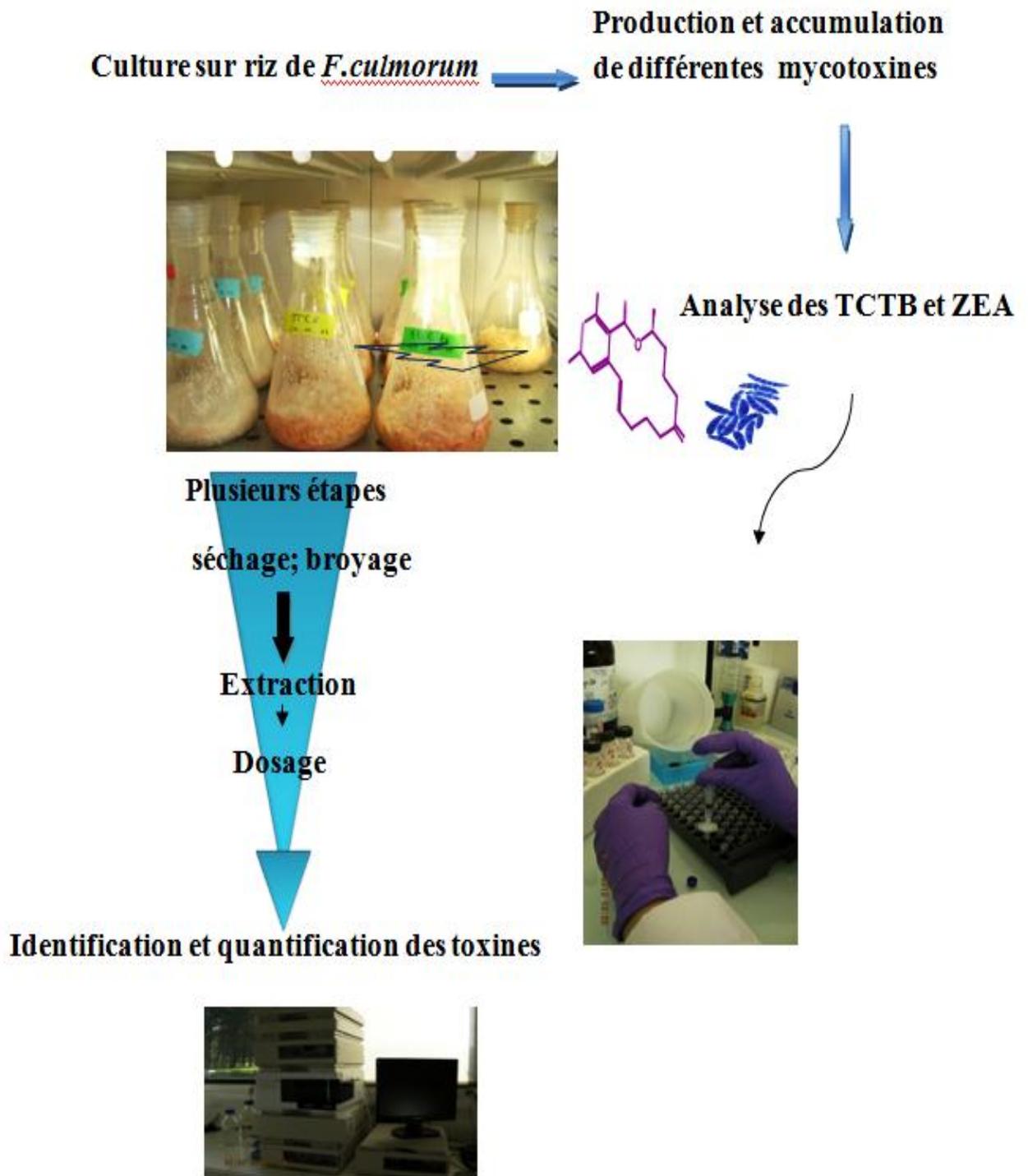


Figure 13 : Démarche expérimentale suivie au cours de l'extraction des TCTB et ZEA à partir de farine de riz contaminée par les quatre isolats de *F. culmorum* pour l'identification des chémotypes et évaluation du potentiel toxigène des *Fusaria*.

2.4. Sensibilité des variétés algériennes de blé « introduites et autochtones » à la fusariose de l'épi et à l'accumulation des toxines

La sensibilité de huit variétés algériennes de blé dur et de blé tendre a été étudiée pendant deux années successives 2012 et 2013, par la réalisation d'inoculations artificielles des épis en plein champ. Ces variétés ont été choisies afin de tester quatre variétés anciennes et quatre variétés récentes les plus cultivées en Algérie et deux lignées récemment sélectionnées avec les deux parents vis à vis de l'espèce *F. culmorum*, responsable de la fusariose de l'épi. Dans un essai préliminaire réalisé en 2011 les quatre isolats utilisés dans notre étude ont été évalués pour leur capacité à causer la fusariose de l'épi en plein champ. Ces isolats ont été pulvérisés au stade floraison sur les épis de deux génotypes de blé Vitron et Arz.

2.4.1. Matériel fongique

Quatre isolats de l'espèce *Fusarium culmorum* (BT11, BD11, T5 06, T7 06) obtenus à partir de cultures monosporales pures, ont servi à l'inoculation artificielle en plein champ, ils se sont montrés les plus agressifs dans les essais préliminaires et sont de chémotypes différents. Ces isolats ont été obtenus à partir de l'épi, en premier lieu identifiés comme *Fusarium culmorum* en se basant sur la morphologie des conidies en se référant à la clé d'identification de Leslie et Summerell (2006). Ils ont été confirmés par la suite par une identification moléculaire qui a été réalisée par PCR (Réaction polymérisation en chaîne) en temps réel avec des amorces spécifiques des espèces.

2.4.2. Matériel végétal

Quatre génotypes de blé semi tardives et quatre génotypes précoces ont été utilisés. Il s'agit des deux espèces de blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) et de blé tendre (*Triticum aestivum*). Ces variétés ont été choisies car elles présentent des niveaux différents de résistance à la fusariose, d'après le classement établi par l'ITGC d'Alger pour les variétés sensibles. Deux lignées de blé ont été également testées la deuxième année et choisies en fonction des résultats d'un essai de résistance préliminaires en plein champ effectués en 2012 (résultat non illustré). Cet essai inclut également les variétés parentales de G4; G9 (Parent 1 : Simeto133) et G10 (Parent 2 : Ardente). Pour des raisons techniques, les deux autres variétés parentales ne pouvaient être évaluées dans notre analyse de 2013 (Tabl. 8).

Tableau 8: Liste des différentes variétés et lignées utilisées dans les essais en plein champ

Genotype	Espèce	Origine	Cycle végétatif
Arz	BT	CIMMYT	Semi-Précoce
HD1220	BT	CIMMYT	Précoce
Florence Aurore	BT	Locale	Tardif
Mahon Démias	BT	Espagne	Tardif
Mohamed Ben Bachir	BD	Locale	Tardif
Bidi 17	BD	Locale	Tardif
Chen's	BD	ICARDA	Précoce
Vitron	BD	Espagne	Précoce
G1-F14 lignée 1	Lignée de P3-P4	ENSA Algiers	Précoce Tardif
G4-F14 lignée 4	Lignée de P1-P2	ENSA Algiers	Précoce
G9-P1 Simeto133	BD	France	Précoce à très précoce
G10-P2 Ardente	BD	France	Semi-Précoce

Les parcelles élémentaires étaient localisées à la station expérimentale de l'ENSA d'Harrach. Nous avons réalisé quatre essais espacés de deux mètres et plus loin à quarante mètres le cinquième essai constitué des variétés témoins. Dans chaque essai il y a trois blocs avec un écartement de 1m entre les blocs, soit huit micro-parcelles par bloc de quatre lignes et l'espace entre micro - parcelles est de cinquante centimètre. La densité du semis était de 10 graines/ligne « 40 graines/micro-parcelle »; le plan d'expérience adopté pour les 4 essais était un dispositif aléatoire complet (Fig. 14).

Les inoculations sont réalisées lorsque les plantes avaient atteint le stade d'anthèse presque complète, c.a.d au stade floraison (stade 67 à l'échelle de Zadoks et *al.*1977), tandis que la récolte a eu lieu à maturité physiologique.

2.4.3. Préparation de l'inoculum

Les souches utilisées sont préalablement repiquées sur boîte de PDA et placées 10 jours à l'étuve à 25°C à l'obscurité. Les suspensions de spores sont réalisées par grattage et filtration des cultures.

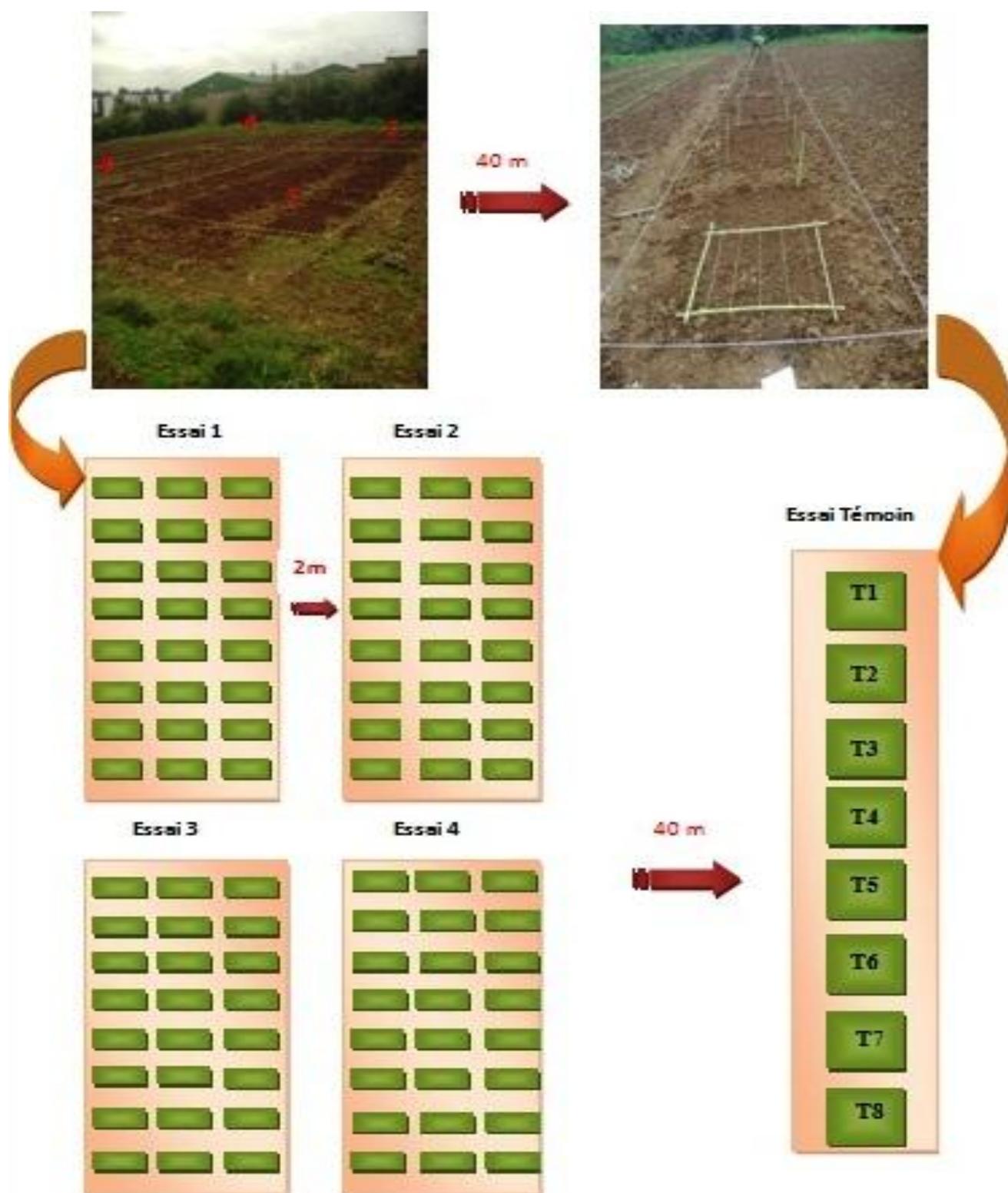


Figure 14: Dispositif expérimental pour l'inoculation en plein champ 2011/2012 et 2012/2013

La concentration en spores est déterminée par comptage sur cellule de Malassez ou Thomas puis ajustée à de 10^4 spores/ mL final dans le milieu (Akinsanmi et *al.*, 2004).

2.4.4. Inoculation

L'inoculation a été réalisée au moment de la floraison complète (stade Zadoks 69), par pulvérisation jusqu'au ruissellement de l'inoculum sur les épis. Cette opération a été effectuée à l'aide d'un pulvérisateur donnant un jet homogène et continu. Compte tenu de la précocité échelonnée des variétés, les inoculations n'ont pas été réalisées le même jour mais à un intervalle de 15 jours entre les variétés (Kleijer et Michel, 2001); 100 épis par micro-parcelle ont été marqués avant l'inoculation. Une fois inocuées, les plantes ont été recouvertes par des sachets plastiques pendant 48 h pour le maintien d'une humidité relative supérieure à 90% pour favoriser l'infection.

Les plants témoins sont constitués par les parcelles où aucune inoculation artificielle n'a été effectuée. Pour maintenir les épis humides après inoculation, un dispositif d'irrigation par aspersion a été mis en place, fonctionnant toutes les 30 mn pendant 20 secondes jusqu'à la maturité des épis.

Tableau 9: Echelle de notation pour l'évaluation de la résistance aux maladies du blé et du triticale (Michel, 2001)

Note	Part de l'épi infectée	Description des symptômes
1	0%	Sans symptômes
2	2,5%	Traces de symptômes, un épillet sur 10 épis montre des symptômes
3	10%	10% des épillets de chaque épi sont infectés
4	25%	Un quart des épillets d'un épi sont infectés
5	50%	La moitié des épillets d'un épi sont infectés
6	75%	Trois quarts des épillets d'un épi sont infectés
7	90%	10% des épillets d'un épi ne sont pas infectés
8	97,5%	Peu d'épillets d'un épi ne sont pas infectés
9	100%	Tous les épis sont morts

2.4.5. Notation des traits de résistance de la fusariose de l'épi "FHB"

Le nombre d'épillets déverdis a été noté avant le déverdissement physiologique (20 jours après l'inoculation, sur les 100 épis pré-identifiés. Le système de notation utilisé est basé sur une échelle de 1 à 9 (1 = sans symptômes et 9 = épi mort) (Tabl. 9). L'incidence de la fusariose sur les différentes variétés testées, est estimée en calculant l'indice d'attaque en % des épis fusariés selon la formule suivante:

$$IA\% = \%épi1 + \%épi2 + \%épi3 \dots \dots \%épin \quad / \quad NTépi$$

IA%: l'indice d'attaque en pourcentage; NT épi: nombre total d'épi pré-identifiés

Au total 220 échantillons de grains de blé ont été analysés provenant d'une expérimentation par inoculation artificielle en plein champ, durant les deux années 2012 et 2013.

2.5. Evaluation de la sensibilité des variétés testées à l'accumulation de mycotoxines

Au stade maturité GS 90 (Zadoks et *al.*, 1974), 100 épis pré-identifiés ont été récoltés. Après l'égrenage des épis à la main, 50 g de graines de chaque variétés ont été broyées pour analyser par HPLC la teneur en mycotoxines accumulée au niveau des grains fusariés. L'analyse et dosage des TCTB et zéaralenone au cours de ces essais ont été réalisés selon le protocole décrit précédemment (partie 3. P. 46).

2.6. Estimation de la biomasse fongique dans les grains de blé fusariés

Afin de développer des variétés résistantes à la fusariose et plus particulièrement à l'accumulation de TCTB, il est important de connaître les relations qui existent entre les espèces présentes et les teneurs en toxines dans les grains de blé et où de nombreux travaux ont été publiés (Niessen et *al.*, 2007). De très bonnes corrélations ont été mises en évidence sur blé entre les teneurs en DON et les quantités d'ADN de *F. graminearum* et *F. culmorum*.

Pour apprécier le développement fongique de *F. culmorum* sur les épis de blé à maturité, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires. Une technique biochimique a été utilisée et qui consiste à estimer la biomasse fongique par le dosage de l'ergostérol au niveau des grains de blé par HPLC-UV; l'ergostérol étant un stérol spécifique des membranes fongiques. Ce composé est utilisé comme marqueur précis d'infection fongique chez les plantes (Gilbert, 2001 et Seitz et *al.*, 1977).

La deuxième technique utilisée pour ce dosage est la PCR quantitative avec des amorces gène-spécifiques afin de quantifier l'ADN de *F. culmorum* au niveau des grains contaminés.

2.6.1. Estimation de l'ergostérol au niveau des grains de blé par HPLC-UV

2.6.1.1. Extraction de l'ergostérol

La méthode d'extraction et de dosage de l'ergostérol a été mise au point au laboratoire de l'INRA Bordeaux, et adaptée de Saraf *et al.*, (1997) et de Marin *et al.*, (2005). A cet effet 30 mg de grains broyés mis en suspension dans 2 ml de KOH/MeOH (1:10, w/v) sont placés pendant 1 h à 80°C puis refroidis rapidement dans de la glace. Par la suite 40 µL d'étalon interne de 7-dehydrocholestérol (500 mg/L dans du méthanol) sont additionnés au tube auquel est rajouté 1 mL d'eau. Une extraction est effectuée par deux fois 2 mL d'hexane. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 3 min, les phases organiques sont collectées et évaporées à sec sous flux d'azote sans chauffer. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en attendant l'analyse.

2.6.1.2. Analyse de l'ergostérol par HPLC-UV

Les extraits secs sont repris dans 1 mL de méthanol puis filtrés sur un filtre de 0,45 µm avant l'analyse en HPLC. L'analyse de l'ergostérol est réalisée selon la méthode ERGOKIN, sur une colonne KINETEX, 2,6µ XB-C18 100A (150 x4 ,6mm) (Phenomenex) maintenue à 40°C (Tabl.10). Le débit est fixé à 0,8 mL/min pour une durée totale d'analyse de 15 min. Un gradient isocratique de 100% de méthanol a été utilisé; Le volume d'injection est de 20 µL et la détection s'effectue à 282 nm. L'identification de l'ergostérol se fait grâce au temps de rétention et à son spectre UV mesuré entre 190 et 400 nm. La quantification est réalisée par étalonnage externe et les teneurs en ergostérol sont corrigées par rapport à l'étalon interne.

2.6.2. Analyse par PCR-Q avec des amorces gène-spécifiques afin de quantifier l'ADN de *F. culmorum*.

2.6.2.1. Extraction d'ADN génomique sur matrice blé

L'ADN génomique total a été extrait à partir de 100 mg de blé broyé avec le Mini Kit DNeasy® Plant selon les instructions du fournisseur (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Tableau 10 : Paramètres des différentes méthodes chromatographiques utilisées au cours de l'étude.

Paramètres	Composés analysés		
	Acides phénoliques	Ergostérol	TCT B
Appareil	chaîne HPLC Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diodes DAD		
Type de colonne	ZORBAX SB-C18	ZORBAX SB-C18	ZORBAX Eclipse® XDB-C8
Dimensions de colonne	5µm, 250 mm x 4,6 mm	5µm, 250 mm x 4,6 mm	5µm, 150 mm x 4,6 mm
Température four	30°C	30°C	40°C
Volume d'injection	5 µL	20 µL	5 µL
Débit phase mobile	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Solvant A	eau MilliQ, acide formique 2%	méthanol	eau MilliQ, pH 2,6 (acide phosphorique)
Solvant B	acétonitrile	/	acétonitrile
Gradient	5-15% B (30 min), 15-50% B (10 min) 50-90% B (5 min), 90% B (3 min), 90-5% B (2 min), 5% B (10 min)	isocratique	5-30% B (14 min), 30-90% B (10 min) 90% B (5 min), 90-5% B (2 min) 5% B (14 min)
Détection UV-Vis	260 nm, 280 nm, 320 nm et 360 nm	282 nm	230 nm
Durée totale de l'analyse	60 min	18 min	45 min

Un broyage additionnel avec une bille de tungsten à l'aide d'un TissueLyser® (Qiagen, Courtaboeuf, France) a été réalisé deux fois à la fréquence de 30 Hz pendant 45 s. La concentration d'ADN total extrait a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop® 1000 (ThermoFisher scientific, Courtaboeuf, France) à 260 nm. L'ADN génomique total a été dilué à une concentration finale de 20 ng/µL pour chaque échantillon.

2.6.2.2. Quantification de *F. culmorum* dans les grains de blé contaminés par la technique de PCR en Temps Réel

Nous avons utilisé le même protocole que les analyses par PCR quantitative avec détection de fluorescence (SYBR® Green) qui ont été réalisées à l'aide du système LightCycler® 2.0 et du logiciel LightCycler version software LCS4 4.0.5. 415 (Roche, France) décrit précédemment.

L'amorce utilisée est *Tri5* Rios (Rios et al. 2009) à une concentration finale de 0.5 µM et les analyses ont été réalisées en triplicats. Les amplifications de PCR quantitative ont été réalisées pendant 45 cycles, dont les conditions de la PCR sont présentées à la figure 15, selon les conditions recommandées par le fournisseur (Qiagen). Un gène de blé -Rubisco- a été utilisé comme contrôle interne.

L'utilisation d'un ciblage de gène de la plante a été permise afin de normaliser la quantification l'ADN de *Fusarium* par l'amplification de gènes cibles dans les échantillons de blé.

Les valeurs des "crossing point" (C_p) expérimentalement mesurées (valeur moyenne de trios répétitions) obtenues pour le gène de référence et les gènes cibles ont été normalisées par rapport aux valeurs de C_p obtenues pour le gène de référence en utilisant le logiciel REST[®] REST-384 (Relative Expression Software Tool). Ce modèle mathématique prend en compte des différences d'efficacité entre le gène de référence et les gènes cibles (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

Les courbes standard ont été générées par dilution en série d'ADN de *F.culmorum* INRA 268 /3Adon (20 ng à 0.002 ng). La Taq polymérase est activée après 10 min à 95°C. L'amplification des gènes cibles est réalisée en 45 cycles et la fluorescence est mesurée à chaque fin de cycle. Après 45 cycles d'amplification, la courbe de dénaturation est tracée en faisant varier la température de 65°C à 95°C par paliers de 0,1°C/s avec mesure de la fluorescence à la fin de chaque palier.

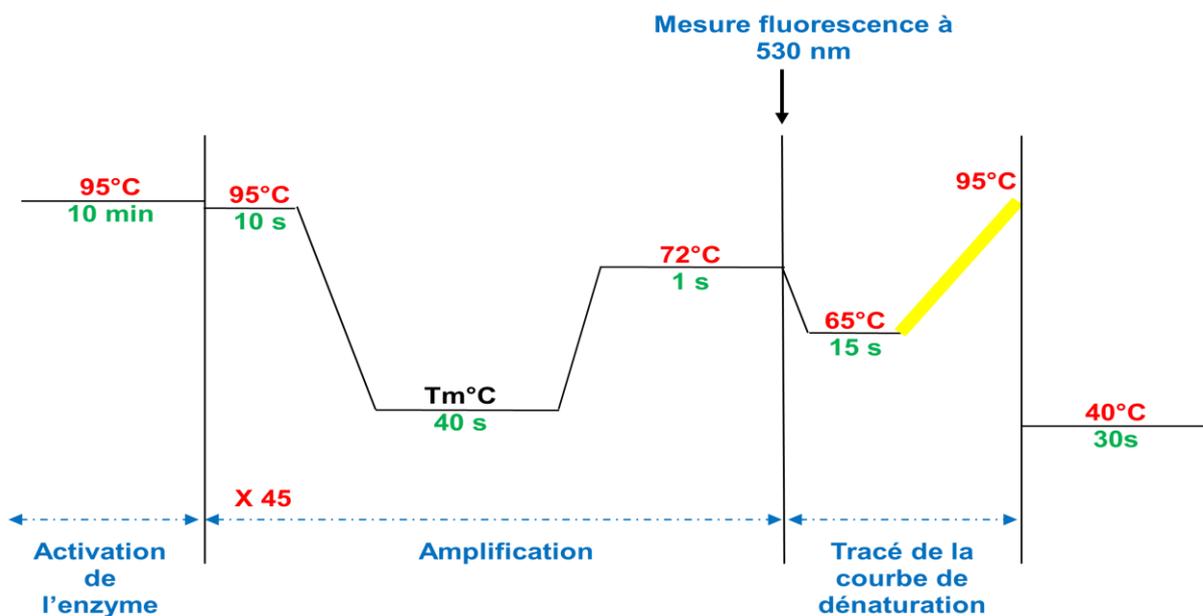


Figure 15 : Etapes des amplifications de PCR quantitative.

2.7. Extraction et dosage des acides phénoliques

Dans notre hypothèse la différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines serait liée à des composés biochimiques endogènes qui diffèrent selon des variétés de blé et par l'existence de composés capables d'interférer avec la mycotoxinogénèse des *Fusarium spp.* En effet différentes molécules candidates ont des effets modulateurs de la biosynthèse des mycotoxines de *Fusarium*, en particulier les composés phénoliques, les peptides, les caroténoïdes, le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique (Boutigny 2010 et *al.*).

Les actions du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes sur la biosynthèse des TCT B par *F. graminearum*, ont été largement étudiés par Ponts (2005), montrant que ces molécules pro oxydantes auraient un effet activateur de la toxinogénèse (Ponts, et *al.*, 2005; Ponts, et *al.*, 2011). Les acides phénoliques nous intéressent dans notre étude, pour cela nous avons analysé les acides phénoliques liés aux parois par des liaisons esters des variétés et lignées utilisées dans cette étude, leur extraction, leur identification et leur quantification ainsi que le mécanisme de glycosylation des trichothécènes B impliqués dans la dégradation ou la détoxification des toxines par de tels composés.

2.7.1. Extraction des acides phénoliques liés aux parois par des liaisons esters

L'extraction des acides phénoliques liés aux parois par des liaisons esters est la méthode adaptée décrite par Bily (2003). Dans un corning de 15 mL, 100 mg de grains broyés sont hydrolysés par 4 mL d'hydroxyde de sodium NaOH (2 M) pendant 2 h sous agitation. Les échantillons sont ensuite acidifiés à pH 2 avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique HCl (12 M) puis extraits par 5 mL d'acétate d'éthyle après agitation pendant 5 mn. Les échantillons subissent une centrifugation de 5 mn à 5000 rpm et 4 mL sont collectés dans un vial de 10 mL. L'extraction est répétée une seconde fois et les 8 mL de fraction organique sont évaporés à sec à 35°C sous flux d'azote. Les extraits secs sont stockés à -20°C jusqu'aux analyses.

Tableau11: Caractéristiques des composés phénoliques séparés par la méthode d'analyse HPLC

Composés phénoliques	λ max (nm)	temps de rétention (min)
Acides phénoliques (dérivés acides benzoïques)		
acide gallique	280	4,79
acide protocatéchuïque	260	8,86
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	260	14,35
acide vanillique	260	18,56
acide syringique	280	21,22
Acides phénoliques (dérivés acides cinnamiques)		
acide férulique	320	33,06
acide <i>p</i> -coumarique	320	27,89
acide caféique	320	18,89
acide sinapique	320	34,29
acide chlorogénique	320	16,29
Flavanols		
catéchine	280	15,35
épicatéchine	280	22,59
Flavonols		
kaempférol	360	41,9
quercétine	360	40,11

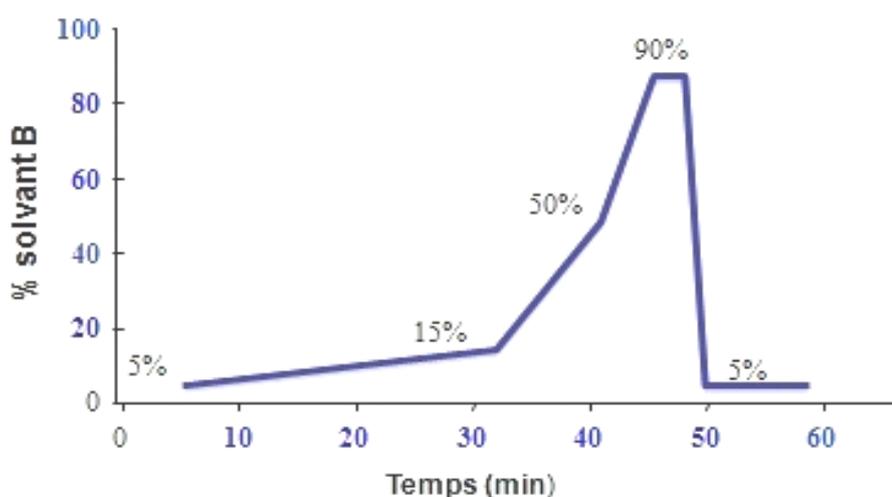


Figure 16 .Gradient pour l'analyse des acides phénoliques par HPLC-DAD

2.7.2. Analyse des acides phénoliques par HPLC-DAD

Avant leur analyse, les extraits secs à doser ont été dissous dans 100 µL de méthanol/eau (50:50,v/v). La procédure d'analyse par HPLC-DAD est celle de Kim *et al.* (2006) adaptée par Boutigny (2007) avec quelques modifications. Cette méthode permet de séparer et de doser 14 composés phénoliques dont 10 acides phénoliques, deux flavanols. Ces composés sont reportés dans le Tableau.11 (voir précédemment).

La séparation des composés phénoliques a lieu lors de leur passage dans une colonne ZORBAX SB-C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) (Agilent, Palo Alto, USA) maintenue à 35°C. La phase mobile est constituée d'eau Milli-Q/acide formique (98:2, v/v) (le solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 60 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 5-15% B en 30 min, 15-50% B en 10 min, 50-90% B en 5 min, 90% B pendant 3 min 90-5% B en 2 min puis 5% B pendant 10 min (Fig. 16) et le volume d'injection est de 5 µL. Les surfaces des pics sont ensuite mesurées simultanément à 260 nm, 280 nm, 320 nm et 360 nm par le détecteur à barrettes de diodes DAD.

L'identification des différents composés phénoliques se fait sur la base de leur temps de rétention et de leurs spectres U.V mesurés entre 200 et 500 nm dont la quantification est réalisée par étalonnage externe. Ce dernier est réalisé avec des composés de référence commercialisés sous forme de poudre lyophilisée chez Sigma-Aldrich Co (St Louis USA).

2.8. Quantification du DON-Glu au niveau des grains de blé

Les plantes peuvent transformer chimiquement la toxine par des activités métaboliques entraînant la dégradation ou la détoxification des mycotoxines. Parmi les stratégies de détoxification, la glycosylation des trichothécènes B est un processus naturel qui existe chez le blé, objet de nos analyses.

2.8.1 Extraction et analyse du DON-Glu par HPLC-MS/MS

La méthode d'extraction est la même que celle utilisée précédemment pour les trichothécènes B. les extraits secs sont repris dans 300 µL d'un mélange méthanol/eau (1:1, v/v) avant l'analyse en HPLC-MS/MS.

Ces analyses ont été réalisées avec un QTrap-LC-MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA), équipé avec une source d'ionisation par électron ébuliseur (ESI), d'un analyseur de masse trappe d'ions et/ou triple quadripôle et une chaîne HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Hewlett-Packard Chem Station Series 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), incluant également un détecteur à barette de diodes DAD (Diode Array Detector).

Dix microlitres sont injectés dans une colonne ZORBAX Eclipse® XDB-C18 (5 µm, 150 mm x 2,1 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) avec une température maintenue à 40°C et un flux constant de 0,250 mL/min. La phase mobile est composée d'une solution d'eau ultra-pure/méthanol (9:1, v/v) (solvant A) et méthanol (solvant B). Le gradient d'élution commence à 10% (v/v) de B pendant 8 min et augmente de manière constante jusqu'à 70% (v/v) de B en 2 min pour atteindre les 100% (v/v) de B dès 12 min et garder cette concentration constante pendant 7 min.

La quantification est réalisée par étalonnage externe avec des solutions de méthanol/eau (1:1, v/v) à concentrations connues de TCTB et TCTB-G à 5, 10, 100, 250, 500 et 1000 ng/L confectionnées à partir de composés de référence achetés sous forme de poudre lyophilisée chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). L'ensemble est contrôlé par le logiciel Analyst® 1.4.2 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Résultats et discussion



3. Résultats et discussion

3.1. CHAPITRE 1. Recensement de la flore fusarienne responsable de la contamination de l'épi de blé en Algérie

Les dégâts les plus redoutables de la fusariose résident dans la production de mycotoxines par les espèces fongiques responsables de la fusariose de l'épi dans les grains attaqués. L'identification de ces espèces est nécessaire pour un meilleur contrôle de la maladie.

Au cours de ce premier chapitre de thèse, nous nous sommes intéressés à rechercher les *Fusarium* spp de blé responsables de la fusariose de l'épi dans différentes régions d'Algérie: régions Nord, Est, Ouest et Sud. Il s'agit de confirmer la présence de cette maladie dans les champs de céréales et éventuellement d'évaluer l'espèce prédominante de ce complexe *Fusarien*, et d'identifier les espèces pathogènes qui lui sont associées dans les différentes zones de cultures des céréales (Fig. 17).

3.1.1. Identification des espèces associées à la fusariose

Les parcelles prospectées ont montré les symptômes de la fusariose dont la fréquence a varié de 40 à 80%. Les pourcentages les plus importants ont été notés dans les régions du Nord, Est et Centre d'Alger, et sont respectivement de 75%, 80% et 64%. Les attaques des épis de blé par les *Fusarium spp* se traduisent le plus souvent par l'échaudage de certains groupes d'épillets sur les épis vert ou de la totalité de l'épi. (Fig. 18). Les grains mûrs récoltés étaient ratatinés, légers, parfois roses. Nous précisons que des épis roses ont été très abondants dans la région Est, alors que les grains de blé mûrs récoltés ne présentaient aucun symptômes. Cependant dans la région saharienne la présence de la maladie a été estimée dans les champs de blé irrigués entre 40% et 55%.

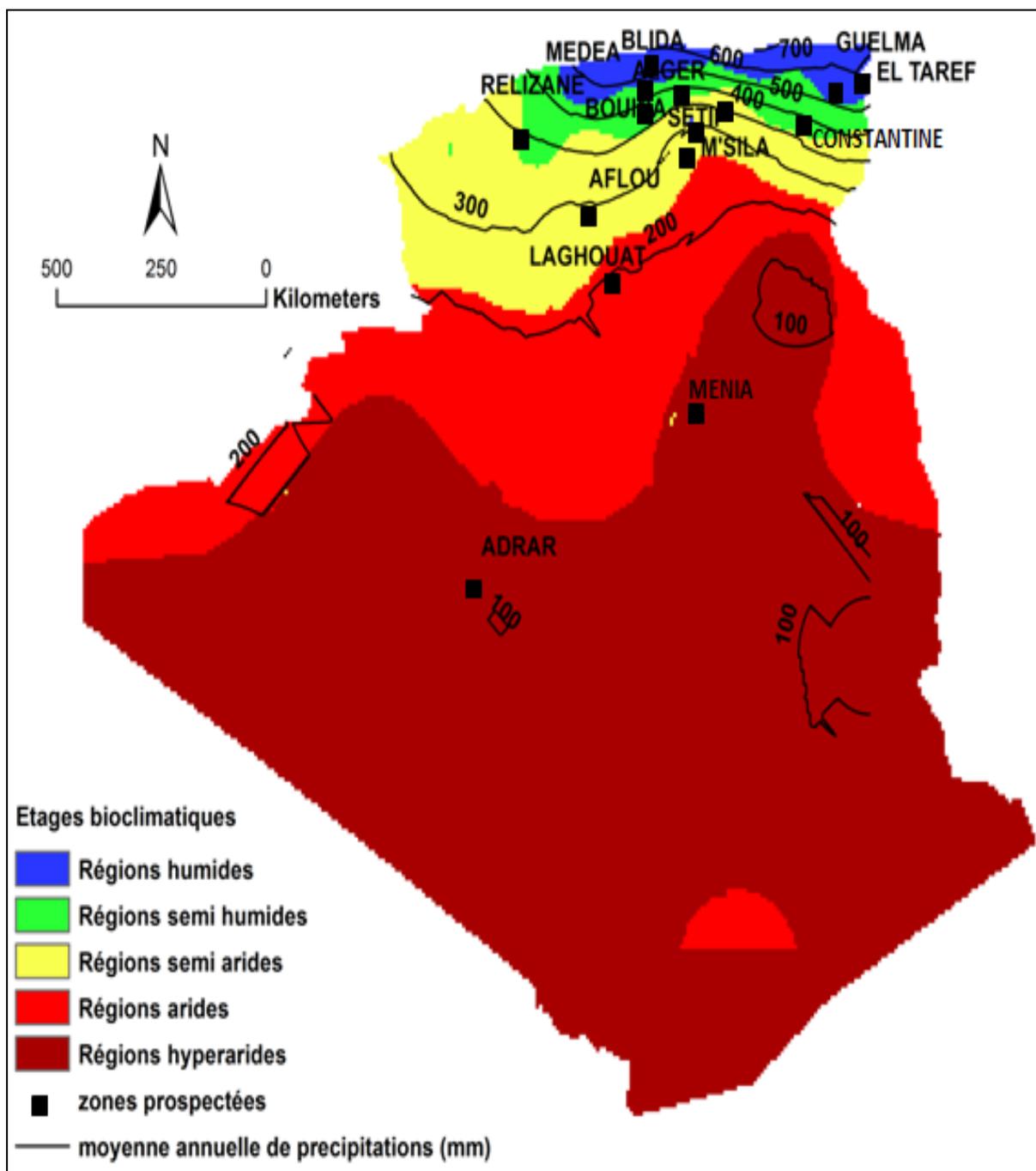


Figure 17: Représentation des champs de blé infestés par la fusariose de l'épi dans les étages bioclimatiques prospectées

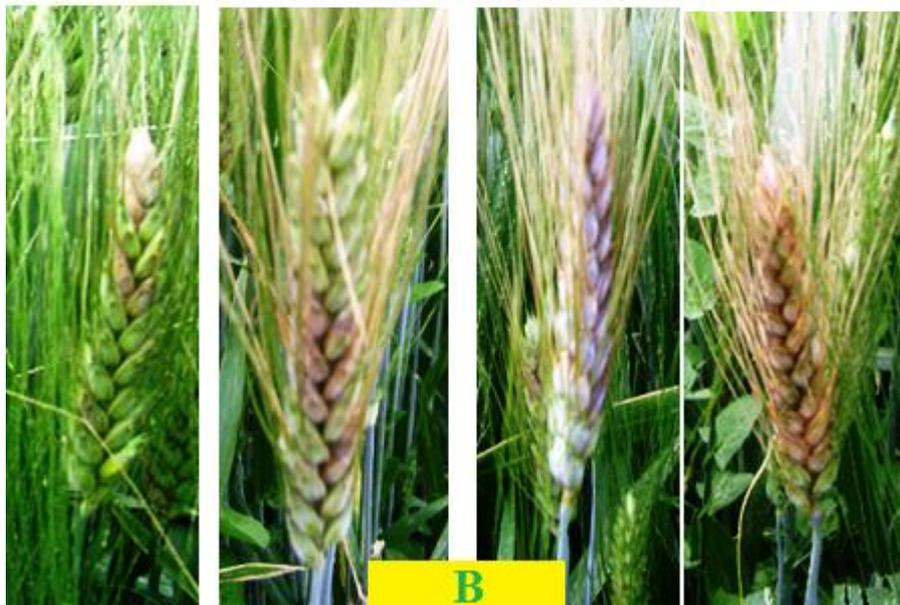
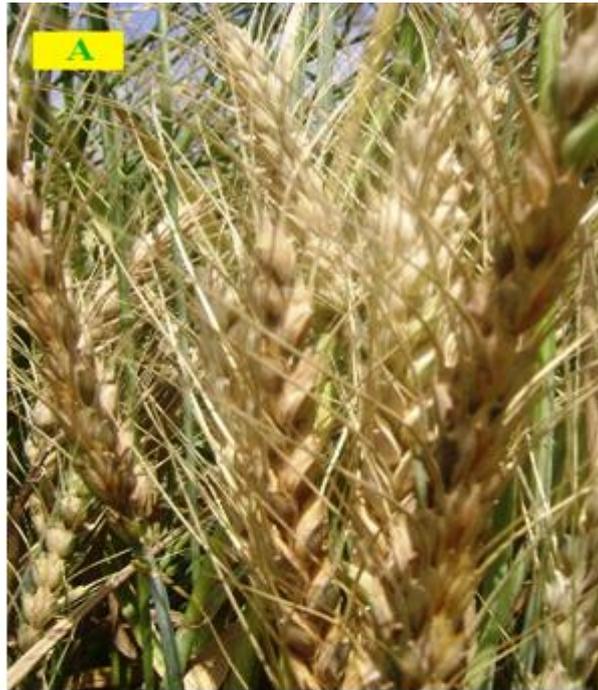


Figure 18: Symptômes caractéristiques de la fusariose de l'épi. (A) échaudage complet des épis. (B) attaque au niveau de quelques épillets du centre qui progresse vers le haut et le bas de l'épi.

Les agents responsables des symptômes de la fusariose de l'épi observés ont été confirmés par des isollements et identification des espèces fongiques associées à cette maladie. Les résultats de l'identification morphologique ont montré que les 150 échantillons analysés à partir des champs de blé, ont été attaqués par les espèces des deux genres *Fusarium* et *Microdochium*: *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum* et *F. avenaceum* et *M. nivale* en se basant sur l'observation de nombreuses caractéristiques anamorphiques et critères microscopiques des isollements sur milieu PDA. Lorsque toutes les informations sont recueillies, l'identification préliminaire! pouvait être réalisée en utilisant les clés de Leslie et Summerell (2006) et Aoki et O'Donnell (1999) (Fig. 19) et (Fig. 20).

Tableau 12: Fréquences d'isolement des espèces de *Fusarium*

Espèces	2011(n=45)		2012 (n=55)		2013 (n=50)		M%
	Echantillons	%	Echantillons	%	Echantillons	%	
<i>F. culmorum</i>	42	93,3	53	96,5	48	96	95,2
<i>M. nivale</i>	30	66,7	40	72,7	35	63,6	67,7
<i>F.pseudograminearum</i>	5	11,1	8	14,5	7	14	13,2
<i>F.sporotrichioides</i>	0	0	3	5,5	5	10	5,16
<i>F.avenaceum</i>	2	4,4	3	5,5	3	6	5,3
<i>F.graminearum</i>	1	2,2	0	0	2	4	2,1

% : pourcentage des espèces détectées dans les échantillons correspondants.

n: nombre des échantillons de blé analysés; E: échantillons; M: la moyenne

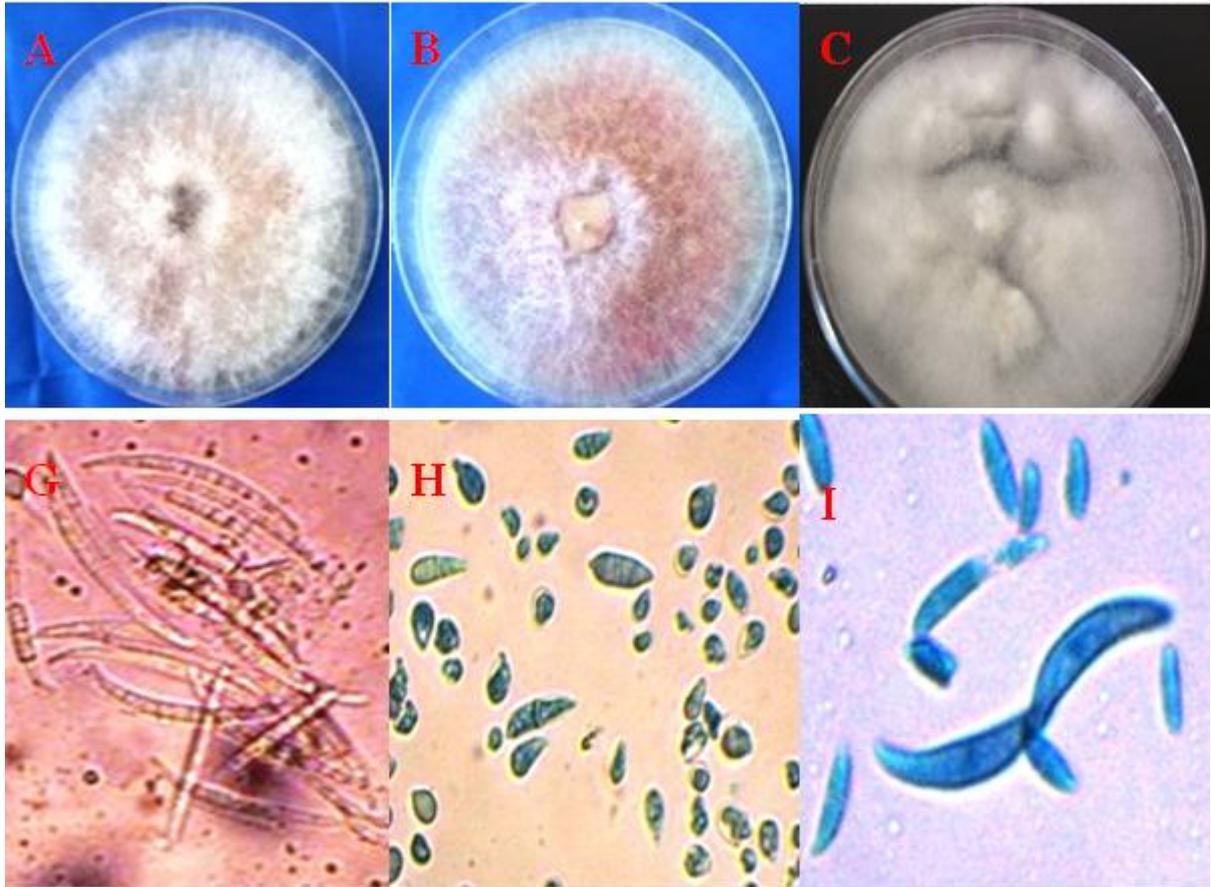


Figure 19: Aspects morphologiques et microscopiques des espèces de *F. avenaceum*; *F. sporotrichioides* et *M. nivale* isolées à partir des épis de blé (G x 40) et (G x 100):

(A) Mycélium abondant de *F. avenaceum*, aérien et très dense généralement blanc, couleur sous culture rouge carmin à ocre avec une marge blanche; (B) Mycélium abondant et aérien blanc à rosé, *F. sporotrichioides*; (C) Mycélium blanc à rose saumon de *M. nivale*.

G) macroconidies de *F. avenaceum* en forme de fuseau, longues et effilées très caractéristique à paroi épaisse; (H) mélange de napiforme et fusiforme septées de *sporotrichioides*; (I) Macroconidies de petites tailles et curvées de *M. nivale*.

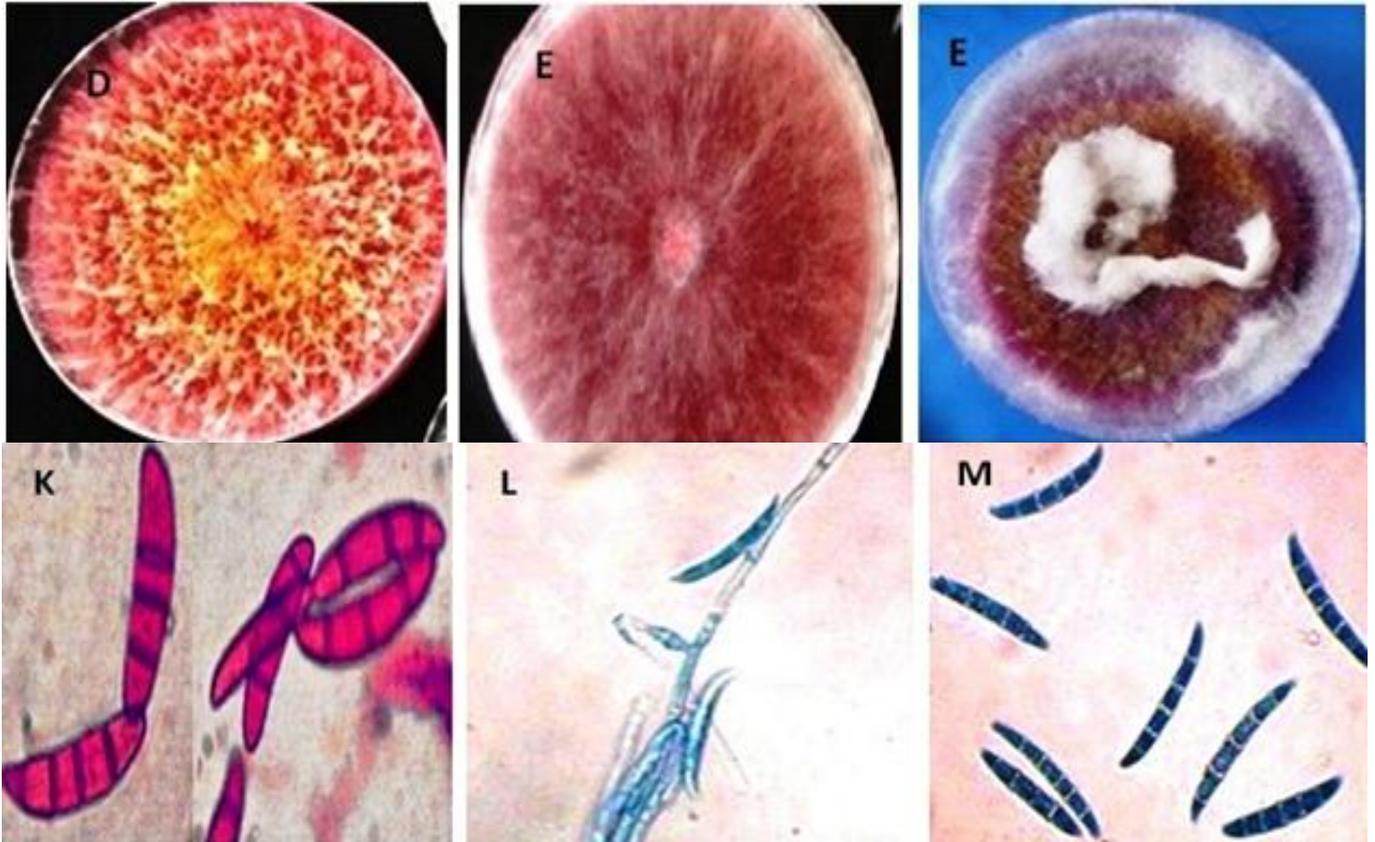


Figure 20: Aspects morphologiques et microscopiques des espèces de *F. graminearum*; *F. pseudograminearum* et *F. culmorum* isolées à partir des épis de blé (G x 40) et (G x 100):

(D) mycélium abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé; (E) mycélium abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé de *F. graminearum* (F) Colonie floconneuse de *F. pseudograminearum* rouge à brun vineu.

(J) Macroconidies arrondie voire papillée de *F. culmorum*, dont la cellule apicale est en forme de mamelon ou de bec; (K) Macroconidies de *F. graminearum* Schwabe en forme de faucille, la forme de la cellule basale distinctement pédiforme et la cellule apicale est en forme de bec, la taille relative moyenne grande; (L) Macroconidies fusiformes, courbées et septées de *F. pseudograminearum*, dont la cellule terminale est longé et pointue.

3.1.2. Identification moléculaire des espèces de *Fusarium* responsables de la fusariose de l'épi

Les isolats sélectionnés parmi l'ensemble des isolats obtenus, ont été d'abord identifiés seulement sur la base de critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Dans une deuxième étape la confirmation de leur identification a été réalisée par utilisation d'outils moléculaires. Nous avons choisi la PCR classique qui a été appliquée pour les isolats de *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* en utilisant des amorces spécifiques de chacune des espèces.

Les résultats de la PCR ont montré que les couples d'amorces utilisées (FC01F/FC01R) ont amplifié une bande 570 pb spécifiques de *F. culmorum* (Nicholson et al., 1998) (Fig. 21), les amorces (EP1-1/EP1-2) ont amplifié une bande 523 pb spécifique de *F. pseudograminearum* (Aoki et O'Donnell, 1999), les amorces (Fg16NF/Fg16NR) ont amplifié une bande 280 pb spécifique de *F. graminearum* (Nicholson et al., 1998) (Fig. 22), les amorces JIAf/JIAr ont amplifié une bande 220 pb spécifique de *F. avenaceum* (Turner et al., 1998) (Fig. 23).

En revanche pour les isolats préalablement identifiés comme *F. poae*, l'analyse moléculaire avec des amorces spécifiques de *F. poae* Fp82F/Fp82R (Parry and Nicholson, 1996) n'a permis de confirmer aucun *F. poea* présent dans notre collection. Cependant, une identification morphologique réalisée à Bordeaux par L. Pinson-Gadais (INRA, MycSA, Villenave d'Ornon, France) a permis d'identifier ces isolats comme du *F. sporotrichioides*. Pour des raisons techniques, ces isolats ne pouvaient être confirmés par une analyse moléculaire. Egalement l'identification moléculaire pour l'espèce identifiée morphologiquement comme *M. nivale* n'a pas été faite; en précisant que ses caractères morphologiques sont très distinctifs des autres espèces.

Ainsi, l'identification moléculaire a permis d'une part de confirmer les identifications morphologiques, et d'autre part de détecter l'espèce *F. pseudograminearum* pour la première fois en Algérie. Les résultats de nos isolements ont révélé qu'en Algérie *F. culmorum* est l'espèce prédominante représentant 95,2 % des espèces isolées. L'espèce *M. nivale* était la deuxième espèce par ordre d'importance avec une fréquence d'isolement de 67,7%.

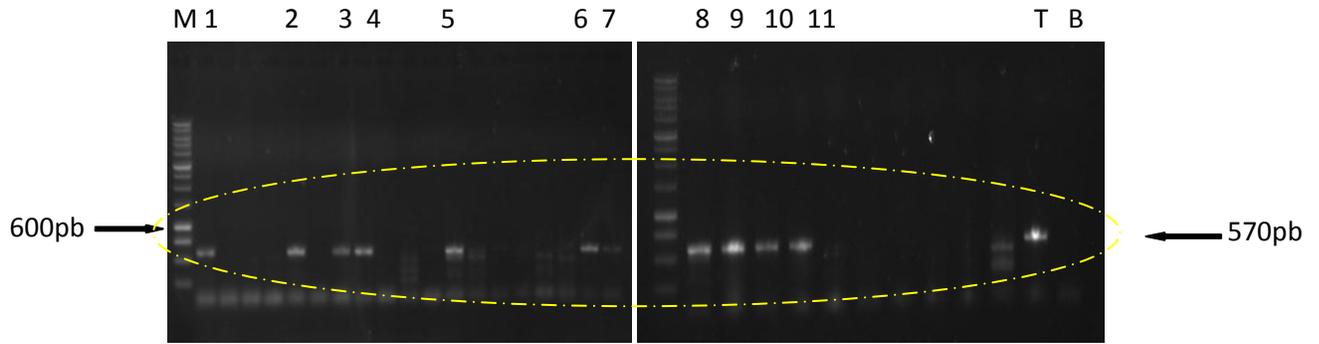


Figure 21: Produits d'amplification spécifique de *F. culmorum*.

M: marqueur de poids moléculaire 100 pb; Ligne 1-11: amplification chez 4 isolats de de *F. culmorum*; T: témoins positif; B: blanc

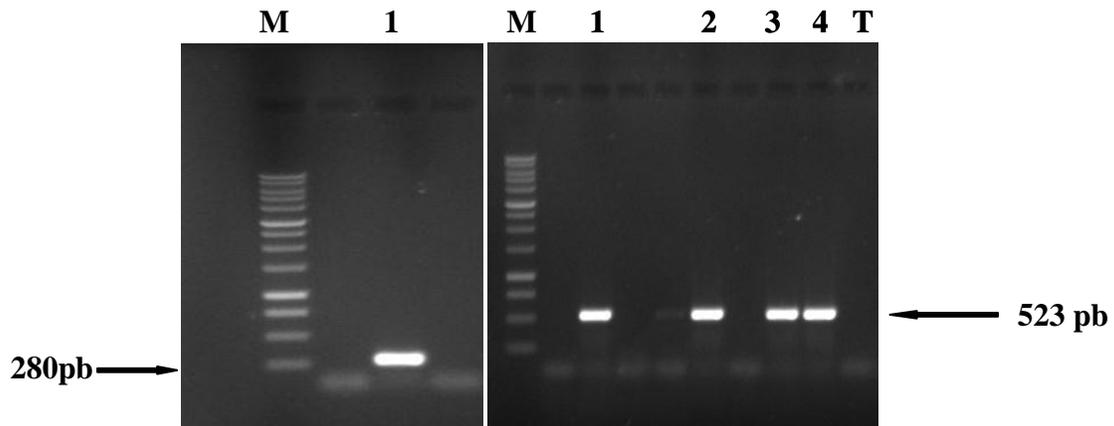


Figure 22: Produits d'amplification spécifique de *F. graminearum* et *F. pseudograminearum*.

M: marqueur de poids moléculaire 100 pb; Ligne 1: amplification chez un isolats de *F. graminearum* ; Lignes 1-4: amplification chez 4 isolats de *F. pseudograminearum*; T: témoins sans ADN.

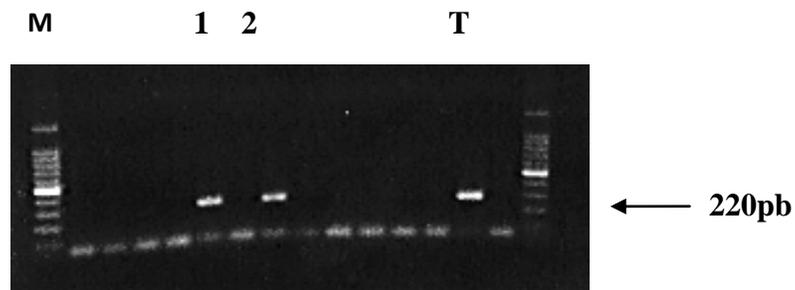


Figure 23: Produit d'amplification de *F. avenaceum*. M: marqueur de poids moléculaire 100 pb; Lignes 1-2: amplification chez 2 isolats de *F. avenaceum*; T: témoin positif.

La présence de *F. pseudograminearum* avec une fréquence de 13,2% a été notée suivie par les espèces de *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum* et *F. graminearum* avec des fréquences relativement faibles (Tabl. 12).

3.1.3. Discussion

Dans un premier temps, notre travail a consisté à confirmer l'existence de la fusariose de l'épi en Algérie, en précisant les espèces fusariennes associées à cette maladie et définir l'espèce de *Fusarium* prédominante.

Les prospections effectuées au cours de cette étude, ont confirmé la prédominance de la fusariose de l'épi; ainsi les champs prospectés ont montré la présence de symptômes de la fusariose de l'épi mais à des pourcentage variables et les échantillons d'épi de blé analysés ont manifesté des taux de contamination pouvant atteindre les 80% par les genres *Fusarium* et *Microdochium*.

Durant les trois campagnes 2011, 2012 et 2013 nous avons noté que l'humidité relative a été généralement plus importante dans les régions Nord, Ouest et Est, notamment durant la période de floraison du blé (fin mars début avril) et dans les régions Sud, la période de floraison a été notée la fin Mars, début Avril mais avec une humidité plus au moins importante.

La fusariose de l'épi de blé a été observée avec des pourcentages importants de 80% surtout dans les plaines intérieures de la région Est. Dans les zones littorales et sublittorales la présence des épis roses était moins importante dans les champs prospectés, et le pourcentage noté est de 64%. Cependant dans la région saharienne la présence de la maladie a été estimée dans les champs de blé irrigués à 40%. En effet, le climat a une incidence majeure sur le développement de la maladie, notamment au moment de la floraison où le climat humide conditionne le développement de l'inoculum (Champeil et *al.*, 2004).

Il ya également le facteur variétal qui est l'élément indiqué comme impactant significativement la présence et la sévérité de la maladie dans les champs de blé (Schaafsma et Hooker, 2007). Les symptômes observés en plein champ ont été par la suite confirmés par l'isolement des pathogènes à partir des épis fusariés.

L'identification morphologique des espèces fongiques isolées des épis de blé attaqués a été basée sur différents critères morphologiques proposés par Aoki et O'Donnell (1999) et Leslie *et al.*, (2006). Une collection de 60 isolats du genre *Fusarium* a été purifiée et exploitée pour l'identification. L'identification morphologique a permis de montrer l'implication de 7 espèces à savoir: *F. culmorum*, , *F. pseudograminearum*, *F. graminearum* , *F. sporotrichioide*, *F. avenaceum* et *M. nivale*. Cette identification morphologique a été ensuite confirmée par PCR en utilisant des amorces spécifiques de chaque espèce (Nicholson *et al.*, 1998; Aoki et O'Donnell 1999; Turner *et al.*, 1998).

Au cours de cette partie de travail, l'identification moléculaire par PCR spécifique, a permis de classer les isolats de *F. graminearum* dans le groupe 1 (*F. pseudograminearum*) d'une part et dans le groupe 2 (*F. graminearum*) d'autre part. Cette classification n'aurait pas été possible sans l'emploi des outils moléculaires. Ce qui confirme les résultats obtenus par Francis et Burgess (1977) qui ont classé les isolats de *F. graminearum* en deux populations (groupe 1 et groupe 2); ces deux espèces présentent des caractères morphologiques très identiques. Par l'application de la technique RFLP (Benyon *et al.*, 2000) avec la séquence d'ADN (Aoki et O'Donnell, 1999) et par analyse des iso enzymes (Laday *et al.*, 2000), deux espèces ont pu être distinguées au niveau de ces deux populations : *F. pseudograminearum* (groupe1) et *F. graminearum* (groupe 2).

Les résultat de l'enquête réalisée en Algérie durant les années 2012-2013 et 2014 ont montré que *F. culmorum* est l'espèce prédominante observée en Algérie sur le blé (résultats non publiés), suivi par le *Microdochium nivale* et *Fusarium pseudograminearum* qui a été observé également assez fréquemment. Des espèces plus minoritaires comme *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* et *F. avenaceum* sont également recensées.

Généralement la présence des deux espèces *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* sont observés principalement dans l'hémisphère Sud (Obanor and Chakraborty, 2014). Elles ont été signalées également comme espèces dominantes dans de nombreux pays méditerranéens, la Syrie et l'Égypte (Alkadri et al., 2013, Balmas et al., 2015) et l'Italie (Rossi et al. 1995, Scherm, 2013, Balmas et al., 2015) y compris l'île de Sardaigne (Balmas et al., 2015). Le *Microdochium nivale* a été aussi décrit dans les régions humides de la Syrie (Van Leur et Bailey, 2000). En Tunisie *M. nivale* var. *nivale* a été identifié comme l'espèce la plus fréquente (63, 5%); elle a été isolée à partir de presque 90% des échantillons récoltés (Kammoun et al., 2010).

Dans ces pays, les deux types de fusariose FHB et FRR ont été recensées, ce qui suggère que les conditions climatiques typiques avec zone aride ou semi-aride peuvent être propices pour ces espèces. Une autre remarque est que dans ces pays, le blé dur et le blé tendre sont largement cultivés, une situation agronomique qui peut-être favorable pour ces deux espèces de *Fusarium*.

La compétitivité des espèces fongiques au niveau de l'épi détermine le spectre et la fréquence des espèces présentes. En effet, une étude antérieure a montré que les taux de *Fusarium* spp ont été réduits par la présence de *M. nivale* (Simpson et al. 2004). D'après nos résultats, *F. culmorum* semble être négativement influencé par la présence de *M. nivale*.

Une diminution dans la fréquence de l'espèce *F. culmorum* a été signalée dans plusieurs régions du monde, comme les Pays-Bas (Waalwijk et al., 2003), la France (Ioos et al., 2004). D'autres facteurs peuvent contribuer à cette diminution de fréquence comme les pratiques culturales, le climat et les traitements par les fongicides.

Nous avons constaté d'après les résultats de la PCR, la présence de l'espèce *F. graminearum* dans les champs de céréales des régions du sud du pays notamment isolées des échantillons provenant de la région d'El-Menia et El Assafia. La présence de cette espèce peut l'expliquer par l'extension de la culture de maïs dans ces régions au cours de ces dernières années.

Le climat chaud de ces régions avec les irrigations favoriserait le *Fusarium graminearum* qui préfère les températures élevées, alors que *F. culmorum*, *F. avenaceum*, et *M. nivale* ont tendance à dominer dans des régions plus froides (Doohan et al., 2003 ; Parry et al., 1995 ; Waalwijk et al., 2003 ; Xu et al., 2005).

Waalwijk et al., (2003) ont signalé un changement dans la population de fusariose à savoir la prédominance du *F. culmorum* dans les années 1990 aux Pays-Bas et son remplacement par du *F. graminearum* en 2001/2002. Le principal facteur causal pour ce changement évoqué précédemment par ces auteurs est l'augmentation de la production de maïs, dans l'agriculture flamande. Cette culture a contribué à la prolifération de *F. graminearum*, étant donné que l'agent pathogène est capable de survivre sur les chaumes de maïs. En outre, la nature homothallique de *F. graminearum* permet la production de grandes masses d'ascospores qui peuvent jouer un rôle dans l'épidémiologie de la maladie.

Les enquêtes publiées pour d'autres régions indiquent clairement que des différences existent entre les différents espaces géographiques et que selon les années, les équilibres d'espèces peuvent être modulés. D'après nos résultats, il apparaît que *F. culmorum* soit l'espèce prédominante quel que soit les lieux d'échantillonnage, mais cela reste à confirmer. Une situation précise et exhaustive de cette flore serait une donnée indispensable pour envisager toute étude d'évolution de la population fusarienne des blés algériens, en réponse à des changements de pratiques agronomiques ou climatiques.

3.2. CHAPITRE 2. Potentiel toxigène et chémotypage de *F. culmorum*

La fusariose a été identifiée comme un facteur majeur limitant la production du blé dans plusieurs parties du monde (Stack, 2000). La diversité des espèces fusariennes susceptibles d'infecter les épis de blé est très large. Au sein d'une espèce donnée, il existe des souches présentant des caractéristiques très différentes en terme de leur capacité à produire des mycotoxines (Anderson *et al.*, 1989).

Le chémotype d'une souche correspond au type de trichothécènes qu'elle est capable de produire, parmi les deux chémotypes majeurs chez *F. culmorum*. Le chémotype DON pour les souches produisant du déoxynivalénol et formes acétylés, le chémotype NIV pour celles produisant de la nivalénol et la fusarénone X (Sydenhamet *al.*, 1991). Au sein du chémotype DON, on distingue le sous chémotype DON/3ADON accompagnant la production de déoxynivalénol (Miller *et al.*, 1991). Pour limiter au mieux la contamination des céréales par des mycotoxines de *Fusarium*, il est primordial de caractériser les espèces de *Fusarium*, associées à la fusariose de l'épi, en terme de potentiel toxigène.

Les résultats de l'identification moléculaire présentés dans le chapitre 1 ont révélé que *F. culmorum* est l'espèce prédominante sur blé en Algérie durant les trois années 2012, 2013 et 2014. Compte tenu de ces données, nous nous sommes proposés d'analyser le potentiel toxigène de 40 isolats de *F. culmorum*. Dans un premier temps, d'identifier la capacité des isolats de *F. culmorum* comme potentiellement producteur de trichothécènes par l'amplification de la région du gène *Tri5* par PCR, identifier le chémotype des isolats de *F. culmorum* correspondant au type de trichothécènes qu'ils sont capables de produire par Q-PCR. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à quantifier par HPLC la production des TCTB des isolats de *F. culmorum* de chémotypes différents.

3.2.1. Analyse par PCR du potentiel toxigène des isolats de *F. culmorum*

3.2.1.1. Identification du potentiel toxinogène

L'identification du potentiel toxinogène de 40 isolats de *Fusarium culmorum* a été basée sur l'amplification spécifique du gène *Tri5* en utilisant l'amorce Tox5 développée par Niessen et Vogel (1998). Le gène *Tri5*, impliqué dans les premières étapes de la voie de biosynthèse des trichothécènes, semble répondre de façon positive, le gène *Tri5* s'est exprimé chez tous les isolats de *F. culmorum*. Le résultat de cette amplification a montré que tous les isolats testés ont produit un amplicon de 650 pb, confirmant ainsi la présence du gène *Tri5* tel que décrit par Niessen et Vogel (1998).

3.2.1.2. Analyses des chémotypes des isolats de *F. culmorum* par PCR avec détection de la fluorescence (SYBR[®] Green) en temps réel

La Q-PCR est une approche prometteuse, qui a été réalisée pour identifier les chémotypes des isolats de *F. culmorum* et la détection de l'ADN par le SYBR Green qui est basée sur l'amplification des gènes *Tri12*. Les amorces Q-PCR et sondes (probes) TaqMan[®] basées sur *Tri12*, ont été développées par Kulik (2011) et ont été utilisées par Nielsen et al. (2012). Le *Tri12* du cluster impliqué dans la voie de biosynthèse des trichothécènes code pour une pompe à efflux qui permet d'excréter les trichothécènes à travers la membrane cellulaire dans le milieu environnant (Alexander et al., 1999; Wuchiyama et al. 2000).

Sur l'ensemble des 40 isolats de *F. culmorum* étudiés, le gène *Tri12*- 3 Adon F et R s'est exprimé dans 38 échantillons, ce qui confirme qu'ils sont des producteurs de 3ADON (Tabl. 13). Ceci est expliqué par une augmentation du nombre de molécules de fluorophore liées à l'ADN synthétisé mis en évidence par une augmentation de la fluorescence. Cette dernière est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle par la courbe d'amplification. Ce paramètre dépend de la concentration initiale en ADN; plus la concentration en ADN est petite, plus le Cp sera grand (Fig. 24).

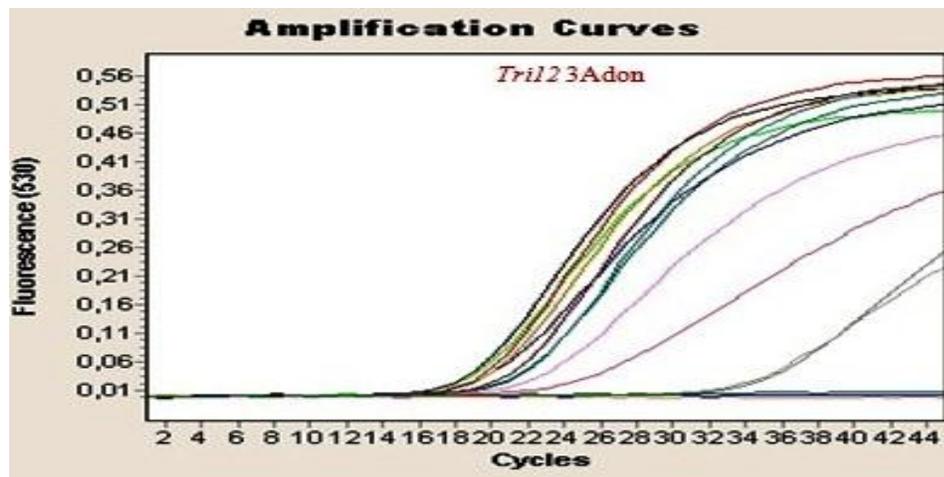
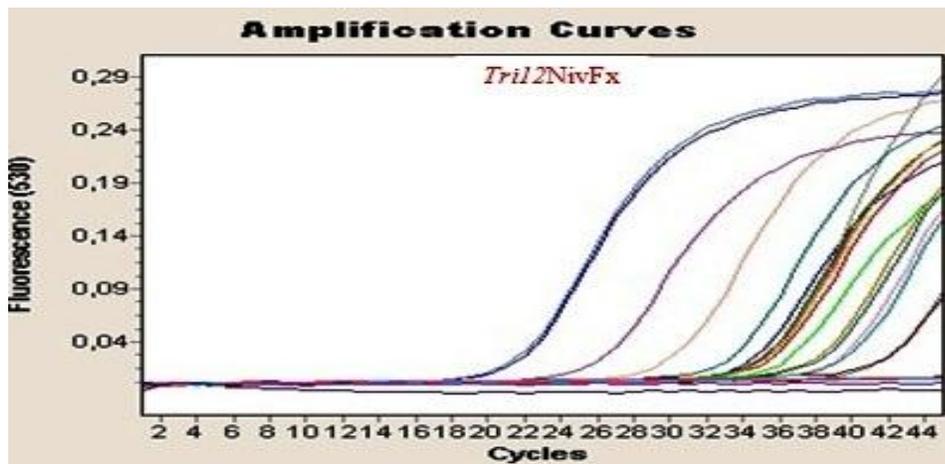


Figure 24: Courbe d'amplification du gène *Tri12* chez les *F. culmorum* producteurs de 3ADON et NIV

Tableau 13: Chémotypes des isolats de *F. culmorum* identifiés par PCR-Q

Régions	Code	année de récolte	Concentration	Pureté260/280	Pureté260/230	Cp (DON3Adon)	Cp(NivFx)
Alger (Oued Smar)	1	2012	159,8	2,07	2,14	19,74	33,24
Alger (Oued Smar)	2	2012	90,2	2,15	1,83	19,87	29,39
Guelma	3	2012	123,4	2,13	1,73	20,28	35,12
Guelma	4	2012	61,9	2,1	1,36	21,24	34,64
M'sila	5	2012	127,7	2,16	1,83	20,14	34,15
El Menia	6	2012	41,1	2,04	1,75	20,08	37,78
Bouira	7	2012	115,3	2,2	2,02	22,42	35,1
Relizane	8	2012	163,7	2,12	1,97	21,22	28,99
Relizane	9	2012	173,9	2,14	1,87	20,12	26,12
Adrar	10	2012	279,6	2,15	2,07	19,77	38,02
Sétif	11	2012	1276,3	2,22	1,92	21,09	33,34
Sétif	12	2012	1087,7	2,27	1,82	20,81	>40,00
constantine	13	2012	150,9	2,18	2,12	20,32	39,59
El Tarf	14	2012	40,5	2,2	1,34	21,13	35,06
Bordj bou arréridj	15	2012	146,6	2,08	1,5	20,79	38,24
Bordj bou arréridj	16	2013	229,8	2,11	1,93	21,3	34,56
M'sila	17	2013	210,6	2,1	1,75	21,31	29,96
M'sila	18	2013	79,5	2,05	0,69	21,66	37,18
Sétif	19	2013	12,7	1,92	0,37	21,54	>40,00
Adrar	20	2013	332,3	2,18	2,2	22,06	31,65
Relizane	21	2013	170,6	2,2	1,98	21,04	32,3
Guelma	22	2013	195,9	2,06	1,25	20,25	>40,00
Guelma	23	2013	135,4	1,97	1,3	21,86	35,23
Alger (Oued Smar)	24	2013	58,4	2,07	1,37	34,27	20,84
Alger (Oued Smar)	25	2013	357,7	2,16	1,84	33,4	20,79
El Menia	26	2013	89,7	2,12	1,81	21,55	34,4
Bouira	27	2013	233,2	2,18	1,9	19,58	34,38
constantine	28	2013	207,9	2,18	1,96	19,44	>40,00
El Tarf	29	2014	426,8	2,17	1,57	21,3	>40,00
Sétif	30	2014	100,7	1,92	1,57	19,83	>40,00
Alger (Oued Smar)	31	2014	168,9	1,9	1,36	22,03	35,15
Guelma	32	2014	98,5	1,96	1,72	19,59	34,62
Guelma	33	2014	534,6	2,04	1,5	21,61	>40,00
Laghouat(Oued Mor:	34	2014	1075,7	2,09	1,96	32,31	29,56
Laghouat(Oued Mor:	35	2014	335,2	2,07	1,69	18,83	34,8
El Tarf	36	2014	232,7	2,02	1,21	24,05	28,33
constantine	37	2014	1023,7	2,12	1,92	21,05	>40,00
Bouira	38	2014	586,8	2,06	1,95	21,66	39,68
Adrar	39	2014	294,3	2,1	1,54	18,22	34,06
Adrar	40	2014	963,8	2,12	1,97	18,77	34,45
	41	Fc 13NivFx				35,51	20,76
	42	Fc INRA24 3ADON				20,56	34,3
	43	Fg16					

Les valeurs de crossing point (Cp) mesurées ont montré que ces isolats sont de chémotype DON/3Adon. Les deux autres isolats ont montré les mêmes valeurs Cp que la souches de référence Fc13NivFX (INRA Bordeaux), et donc ce sont des producteurs NIVFX. Finalement, nous pouvons remarquer que nos chémotypages sont en accord avec la littérature, c'est-à-dire que les *F. culmorum* semblent pouvoir être 3 ADON ou NIV/FX. Ainsi, dans cette population algérienne de *F. culmorum*, la dominance est pour le chémotype DON3/Adon (95%) par rapport au chémotype NIV (5%).

3.2.2. Caractérisation quantitative du potentiel toxigène de *F. culmorum*

3.2.2.1. Analyse par PCR spécifique pour la séquence du gène *Tri12*

Nous avons voulu confirmer le résultat précédent obtenu par Q-PCR. En choisissant sur l'ensemble des 40 isolats de *F. culmorum* étudiés quatre souches de *Fusarium culmorum* de chémotypes différents, deux de chemotype DON/3ADON et deux autres de chémotype NIV/FX. Nous avons alors réalisé des essais PCR basés sur l'amplification des gènes *Tri12* (Chandler *et al.*, 2003).

Deux amorces sont utilisées *Tri12*-NivFx F and R et *Tri12*-DON3Adon F and R , les résultats montrent que les 2 isolats BD11 et BT11 ont amplifié un fragment d'environ 282 bp avec l'amorce *Tri12*-DON3Adon Les résultats de cette amplification ont montré que ces isolats sont de chémotype DON. Les deux autres isolats ont amplifié un fragment d'environ 465 bp avec l'amorce *Tri12*-NIVFx dont les résultats de cette amplification ont montré que ces isolats sont de chémotype NIV. Ce résultat montre effectivement que deux isolats sont de chémotype 3-AcDON et les deux autres sont des NIV/FX.

3.2.2.2. Quantification par HPLC de la production des trichothécènes et zearalénone par les isolats de *F. culmorum*

Le potentiel toxigène est défini par la capacité d'un champignon à produire des mycotoxines, de façon qualitative (chémotype DON/ADON ou NIV/FX) et quantitative (Ponts, 2005). Nos souches ont été quantifiées et identifiées comme étant de chémotypes

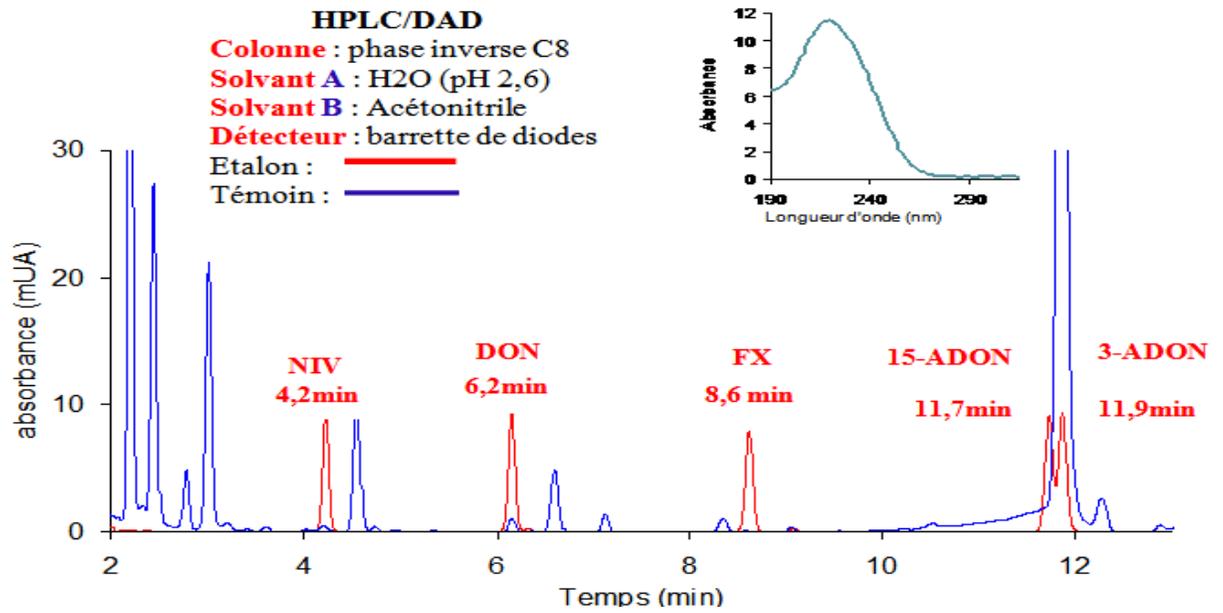


Figure 25: Analyse des trichothécènes par chromatographie en phase liquide (HPLC)

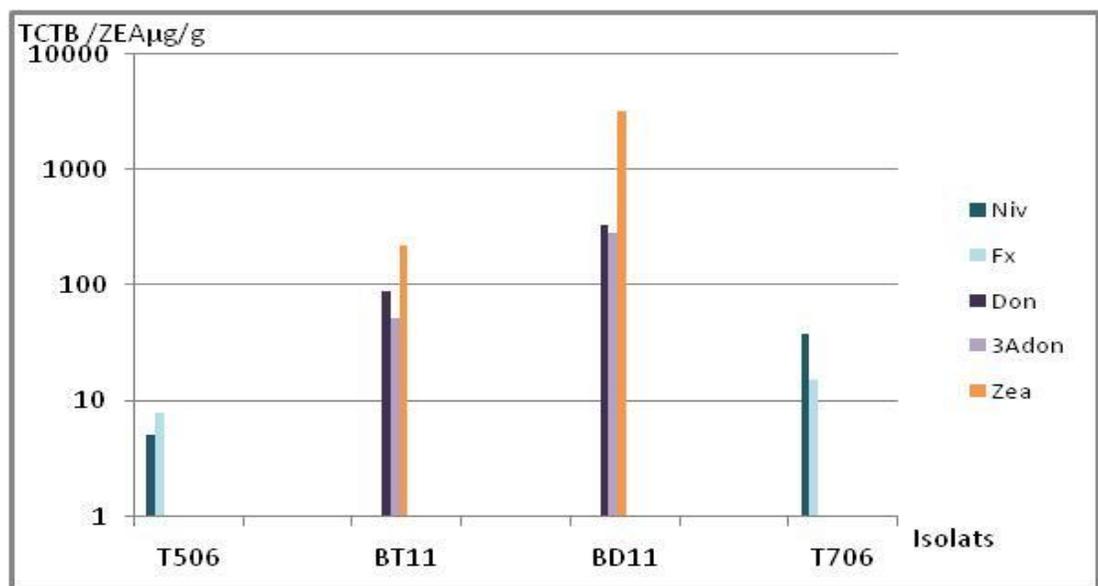


Figure 26: Quantification des TCTB /Zea produites par les isolats de *F. culmorum*.

DON/3ADON et NIV/FX après dosage par HPLC-DAD des TCTB produits après 21 jours d'incubation.

L'analyse des profils chromatographiques, a montré que tous les isolats ont produit les quatre trichothécènes (NIV, DON, FX et 3-ADON) (Fig. 25), et seulement deux isolats ont produit de la zéaralenone (ZEA). Le tableau 28 présente les niveaux de trichothécènes définis en une préculture sur grains de blé stérilisés. Les résultats obtenus ont montré une grande variation des niveaux des trichothécènes produits selon les isolats considérés. Les deux isolats de chémotype DON/3-ADON produisent aussi une grande quantité de zéaralenone. Pour leur potentiel toxigène des niveaux de toxines des deux isolats de chémotype DON/3-ADON sont bien supérieurs à ceux des deux isolats NIV/FX. Le niveau maximal produit de DON; 3-ADON et ZEA sont obtenus avec l'isolat BD11 et sont respectivement de l'ordre de 340.5 µg/g, 284.2 µg/g et 3179.3 µg/g de grains secs infectés. Cependant l'isolat T7 06 a produit un niveau élevé de NIV/FX qui sont respectivement de l'ordre de 38.4 µg/g et 15.2 µg/g (Fig. 26).

Ces résultats ont montré aussi une absence totale de production de ZEA chez les isolats NIV/FX. Nous avons noté aussi après 21 jours d'incubation un taux d'humidité élevé dans deux flacons de riz inoculés, l'eau recouvre presque le grain de riz avec l'isolat BD11 et y en avait un peu moins avec l'isolat T7 06.

3.3.3. Discussion

Les études sur le chémotype des *Fusarium* ont augmenté de 20 fois au cours des dix dernières années dans le monde, étant donné la fréquence de *F. graminearum* et l'importance comme principale cause de la fusariose dans tous les continents, elle est l'espèce la plus étudiée. En revanche moins de travail a été consacré à la détermination de chémotypes chez *F. culmorum*.

L'objectif du deuxième chapitre de cette thèse était l'étude de la mycotoxinogénèse de *F. culmorum*. Elle a été basée sur deux approches: une approche génétique basée sur des techniques moléculaires de PCR classique et la PCR avec détection de fluorescence (SYBR® Green) en temps réel (Q-PCR). Une deuxième approche biochimique est réalisée par HPLC-DAD pour la quantification du potentiel toxigène.

Tout d'abord nous avons identifié le potentiel toxigène d'une gamme d'isolats de *F. culmorum* et défini la capacité de ces isolats à produire des TCTB. Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats testés possèdent le gène *Tri5* codant pour la trichodiène synthase, une enzyme clé dans la biosynthèse des trichothécènes. Par ailleurs l'identification et la quantification en sonde TaqMan par PCR en temps réel, des *Fusarium* producteurs de TCTB selon leur chémotype, ont montré que le gène *Tri12* a pu amplifier l'ADN du groupe des *Fusarium* producteurs de TCTB, ainsi que sa spécificité vis-à-vis de chaque chémotype.

Ces résultats ont permis de confirmer ceux de la littérature. En effet, les isolats de *F. culmorum* sont uniquement de chémotype 3-ADON ou NIV/FX. L'amplification des *Tri12*-3ADON et *Tri12*-NIV montrent une dominance de 95% des isolats du type DON, et seulement 5% sur les 40 isolats se sont avérés de chémotype NIV. Ce résultat concorde avec des études antérieures, qui ont rapporté la dominance du chémotype DON associé à l'espèce *F. culmorum*. En Tunisie les résultats de Rebib et *al.*, (2014) et Ben Amar et *al.*, (2012) ont révélé que 100% des isolats sont de chémotypes 3-ADON et Kammoun et *al.*, (2010) ont donné des pourcentage de 98% (3-ADON) et de 2% (NIV). En Syrie Miedaner et *al.*, (2013) ont indiqué une dominance de 100% pour le chémotype 3-ADON, et Alkadri et *al.*, (2013) ont révélé 40% pour le chémotype NIV et 60% 3-ADON.

Des résultats comparables ont été rapportés par Logrieco *et al.*, (2003) qui ont confirmé qu'en régions méditerranéennes, tous les isolats de *F. culmorum* analysés se sont avérés de chémotype 3-ADON. Dans beaucoup de pays européens, cette dominance a été rapportée comme en France, Italie, la Pologne, la Russie, l'Allemagne et la Hongrie (Boutigny et *al.*, 2014; Mugrabi de Kuppler et *al.*, 2011; Quarta et *al.*, 2005; Ward et *al.*, 2008; Christ et *al.*, 2011 et Tóth et *al.*, 2004), et aussi en Inde (Venkataramana et *al.*, 2013) et au USA (Ward et

al., 2008). Ce pendant, une proportion élevée d'isolats de *F. culmorum* de chémotype NIV a été rapportée en Espagne, Corée du Sud et en Chine (Llorens et al., 2006, Ok et al., 2014, Ndoye et al., 2012). Compte tenu des résultats obtenus, qui confirment la présence et la dominance en Algérie d'isolats de *F. culmorum* de chémotype 3-ADON, il serait intéressant de les prendre en compte lors de l'étude de l'épidémiologie de la fusariose de l'épi.

En effet, il semblerait que les TCTB soient un facteur d'agressivité; la production de DON augmenterait l'agressivité du champignon en inhibant le mécanisme de défense de la plante et en réduisant les barrières telles que la formation de cal entre l'épillet et le rachis (Jansen et al. 2005; Desjardins et Hohn, 1997). En plus, le DON est souvent utilisé pour les études de toxicité aiguë du fait de sa forte occurrence dans les céréales (AFSSA, 2009).

Les résultats de l'identification moléculaire ont été confirmés par une analyse biochimique. Il est évident qu'un suivi continu à l'aide de méthodes complémentaires est toujours nécessaire (Nicholson et al., 2004 ; Desjardins et al., 2008). Il est important de souligner que sans une bonne identification chimique des types différents de trichothécène B, les méthodes génétiques ne sauraient être suffisantes pour déterminer précisément la capacité toxigène d'un isolat (Matias et Quirico, 2014). Ainsi, l'étude moléculaire par PCR permet d'indiquer le potentiel toxigène d'un isolat donné, mais seulement l'analyse biochimique des toxines permet la quantification des trichothécènes et ZEA produits.

De plus, les résultats obtenus ont montré que les niveaux de 3-ADON et NIV/FX produits *in vitro* par les isolats algériens de *F. culmorum* sont extrêmement variables. En effet, ces valeurs ont fluctué de niveaux faibles à des niveaux très forts. Une forte production de ZEA a été observée chez les isolats de chémotype DON. Etonnamment, dans des essais d'inoculation artificielles en plein champ, ces souches n'ont pas produit ou bien ils ont produit des quantités à l'état de traces sur épi de blé de la zéaralénone et la fusarénone X. Ceci suggère qu'au cours de ces expériences, les variétés de blé utilisées ou bien les conditions environnementales ne sont pas conductrices pour la biosynthèse de la zéaralénone et fusarénone X.

Dans des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire MycSA Bordeaux, les potentiels toxigènes des souches de *Fusarium* ont été définis *in vitro* en cultures sur grains.

Les résultats obtenus avaient montré que dans une même espèce on distingue réellement des souches fortes, moyennes et faibles pour leur capacité à produire des trichothécènes (Boutigny, 2008). Cette variabilité de l'expression du potentiel toxigène de *F. culmorum* en culture sur grain semble être influencée par la température (Ramirez *et al.*, 2006), l'humidité relative (Beyer *et al.*, 2005) et le pH (Bily, 2003). Les conditions d'aération (teneurs en O₂/CO₂) ont aussi une influence sur la biosynthèse de mycotoxines (Greenhalgh *et al.*, 1983 ; Miller *et al.*, 1983). La différence de production des DON pourrait être aussi expliquée par la variabilité génétique entre les isolats.

Au sein d'une même espèce et dans des conditions de croissance idéale, certaines souches produisent des quantités importantes de toxines alors que d'autres souches en produisent des quantités non détectables (Bakan, 1998 ; Bakan *et al.*, 2001 ; Wagacha et Muthomi, 2007). Bakan *et al.* (2002) ont montré que la séquence intergénique entre les gènes *Tri6* et *Tri5* de 30 souches de *F. culmorum* productrices de DON présente des variations intra spécifiques corrélées avec les niveaux de trichothécènes produits *in vitro* sur grains.

De plus, au sein des espèces de *Fusarium* productrices de TCT B, les niveaux de toxines produits peuvent varier considérablement. Par conséquent, une souche productrice de TCT B produit soit du DON et ses dérivés acétylés soit de la NIV et son dérivé acétylé. Nous soulignons que la production de DON et de NIV par une même souche de *F. graminearum* a déjà été observée (Sugiura *et al.*, 1990 ; Lori *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 2003).

En outre, plusieurs études signalent la coproduction de la forme acétylée de la part d'une même souche (Alvarez *et al.*, 2009 ; Christ *et al.*, 2011; Kawakami *et al.*, 2014 ; Korn *et al.*, 2011 ; Mugrabi de Kuppler *et al.*, 2011 ; Sugiura *et al.*, 1990 ; Spolti, 2014; Szecsi *et al.*, 2005; Talas, 2012; Ward *et al.*, 2002; Yli - Mattila *et al.*, 2009 et Llorens and *al.*, 2006). Des situations similaires à ceux décrits pour le chémotype génétique peuvent survenir, pour l'analyse biochimique, puisque la production de toxines *in vitro* est très variable et peut ne pas représenter le potentiel toxigène réel de la souche (Malbrán *et al.*, 2014 ; Mirocha *et al.*, 1989 ; Muller et Schwadorf, 1993).

Seule au champ, l'inoculation *in planta* peut montrer la capacité réelle toxinoène de chaque souche (Gang et *al.*, 1998). La production de toxines est souvent variable entre les isolats (Spolti et *al.*, 2014) et certaines souches ne produisent aucune toxine dans des conditions de laboratoire (Tan et *al.*, 2012).

3.3. CHAPITRE 3. Evaluation de la sensibilité des variétés de blé à la fusariose ainsi qu'à l'accumulation de mycotoxines

Le blé dur *Triticum durum* L. sub sp. *Durum* et le blé tendre *Triticum aestivum* L sont les deux types de blé les plus importants et les plus commercialisés. En Algérie 12 variétés de blé dur sont actuellement en production, elles ont été introduites depuis 1980. Sur l'ensemble de ce matériel végétal en production, les variétés Vitron et Waha sont les plus demandées sur le marché. En effet, 65% de la superficie semencière totale n'est plus occupée que par ces deux variétés. Par ailleurs, deux autres variétés Chen's et Gta dur ont progressé ces dernières années pour atteindre un niveau d'occupation respectivement de 7% et 12% de la sole semencière de blé dur (Boufnar-Zaghouane and Zaghouane 2006).

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la résistance de deux types de blé dur à l'infection par *F. culmorum*; il s'agit de variétés autochtones et introduites. Ces informations sont importantes pour le développement d'un matériel génétique résistant à la fusariose de l'épi "FHB". Comme nos résultats l'ont illustré dans la première partie de ce travail, *F. culmorum* est l'espèce pathogène principale responsable de la fusariose de l'épi en Algérie. *F. culmorum* est aussi l'espèce fusarienne principalement incriminée dans la production de mycotoxines de type Trichothécènes B, suite à ces résultats nos recherches dans ce chapitre se sont centrées sur le pathosystème *Fusarium culmorum* / blé. Aucune donnée n'a encore été publiée à notre connaissance sur l'évaluation de la sensibilité des variétés à l'accumulation des mycotoxines chez le blé en Algérie. L'objectif de la réalisation de ces inoculations *in vivo* est de répondre à ce manque de connaissance ainsi que de déterminer l'effet chéymotypage sur l'infection de la fusariose de l'épi.

3.3.1. Etude de la Pathogénicité et l'agressivité des quatre isolats étudiés de *F. culmorum* en plein champ

Tout d'abord, un essai préliminaire a été réalisé en 2011, où quatre isolats de *F. culmorum* ont été testés pour leur capacité d'engendrer la fusariose de l'épi " FHB" en plein champ.

Ils ont été inoculés au stade floraison sur une variété de blé dur Vitron et une variété de blé tendre Arz. Les quatre isolats T5 06, T7 06, BT11 and BD 11 se sont montrés pathogènes et nous avons noté de petites différences dans les valeurs de l'indice d'attaque (IA) qui varie entre 43.5 à 55.25% pour la variété de blé tendre Arz et de 52.5 à 70% pour la variété de blé dur Vitron.

Ces souches ont été identifiées comme étant de chémotypes DON/3ADON et NIV/FX par des méthodes moléculaires et biochimiques dans le chapitre 2. Suite à ces résultats, ces quatre souches ont été utilisées comme souches de référence pour l'évaluation de la résistance d'une gamme de huit variétés de blé dans des essais en plein champ, réalisés sur deux années successives 2012 et 2013 (Tabl. 14).

Au cours de ces essais, l'agressivité des quatre isolats a été évaluée. Une semaine après l'inoculation des épis, des symptômes de la fusariose sur épillets ont commencé à apparaître sur les épis inoculés. A la fin de l'essai (25 jours après l'inoculation), tous les épillets inoculés ont été complètement attaqués (Fig. 27), les épis témoins, n'ont pas montré de symptômes d'attaques.

Dans cette expérience, trois paramètres ont été mesurés sur chaque variété, i) l'indice d'attaque (IA) qui représente les niveaux de maladies observées sur les épis matures; ii) Le développement fongique a été mesuré par la quantification de l'ADN pour l'année 2012 et l'ergosterol (Erg) pour les deux années 2012 et 2013 de *Fusarium* développés dans les grains fusariés ; iii) les concentrations des mycotoxines accumulées au niveau des grains contaminés ont été aussi évaluées pour les deux années. Les résultats sont reportés dans les tableaux 3a et 3b. En tenant compte des paramètres mesurés au cours de ces essais, les résultats ont montré que les quatre isolats de *F. culmorum*, se sont avérés pathogènes sur les différentes variétés considérées.



Figure 27. Symptômes caractéristiques de la fusariose de l'épi. (A) et (C) attaque au niveau de quelques épillets du centre qui progresse vers le haut et le bas de l'épi; (B) Formation de *Sporodochie* orange sur épi; (D) symptômes sur des grains de blé, roses et ridés.

Tableau 14: Les caractéristiques des isolats algériens de *F. culmorum* utilisés dans les essais des inoculations artificielles.

Nom	Espèce	Origine géographique	Production de toxine (a)					IA% (b)	
			DON µg/g	3-ADON µg/g	NIV µg/g	FX µg/g	ZEA µg/g	ARZ (BT)	VITRON (BD)
BD11	<i>F. culmorum</i>	Rouiba	340.5±5.9	284.2±0.2	nd	nd	3179.3±134.9	55.25%	70.00%
BT11	<i>F. culmorum</i>	Rouiba	89.0±9.9	52.6±0.1	nd	nd	222.2±26.5	52.50%	62.50%
T5 06	<i>F. culmorum</i>	OuedSmar	nd	nd	5.1±1.0	7.9±1.2	nd	43.50%	52.50%
T7 06	<i>F. culmorum</i>	OuedSmar	nd	nd	38.4±4.7	15.2±1.2	nd	48.75%	59.25%

a: la moyenne de la quantité de toxine produite sur grains de riz; **b:** essai de pathogénéicité préliminaire réalisé en 2011, **IA:** indice d'attaque; **BT:** blé tendre; **BD:** blé dur

Ainsi, si on se réfère aux symptômes visuels (IA%), l'analyse des échantillons issus des trois répétitions biologiques pour chaque essai, montre des différences conséquentes dans l'agressivité des isolats (voir Tableau 17 et 18, indice d'attaque (IA)). Le test de Tukey montre que les isolats différents significativement ($p < 0.0001$) (HSD) dans leur capacité de causer la fusariose de l'épi.

La comparaison multiple des moyennes (CMM) de l'indice d'attaque en utilisant le test de Newman - Keuls à 5%, a montré que le groupe (A) représente les deux isolats les plus agressifs BD11 et BT11 de chémotype DON, alors que le groupe C et D représente respectivement les deux isolats les moins agressifs T7 06 et T5 06 de chémotype NIV (Tabl. 15).

Quelque soit le paramètre concerné (variété, année, isolats DON/3ADON et NIV/FX), les résultats obtenus montrent des différences conséquentes dans les niveaux d'ergostérol et d'ADN quantifiés ainsi que la quantité de toxine accumulée. Cette hétérogénéité indique aussi que *F. culmorum* n'a certainement pas eu un développement homogène dans les différents épis.

Les souches de chémotype DON se sont significativement plus développées sur épis et ont produit en moyenne davantage de toxines que les individus de chémotype NIV ($p < 0.05$). Cependant l'analyse des variables production de toxine (TCTB) et le développement fongique représenté par l'ergostérol (Erg) donne quatre groupes d'isolats homogènes (Tabl. 16).

3.3.2. Corrélations entre les variables

Il est à noter que les présents résultats des essais en plein champ sont basés sur deux années d'étude et les variables sont calculées sur les résultats des deux années cumulatives. Ainsi, les indices d'attaque (IA) se sont montrés hautement corrélés avec l'ergostérol du champignon (Erg) et les toxines accumulées au niveau des grains (TCTB) dans les quatre essais avec des coefficients de variation de l'essai de $r = 0.9$, $r = 0.88$; $r = 0.85$, $r = 0.9$; $r = 0.77$, $r = 0.72$; $r = 0.70$, $r = 0.69$ respectivement pour T5 06, T7 06, BT11 and BD11. En particulier les quantités de toxines accumulées se sont montrées hautement corrélées avec (Erg) dans les essais de T5 06 et T7 06 avec des coefficients de variation respectivement de $r = 0.87$ et $r = 0.88$. Cependant une faible corrélation Erg / TCTB a été obtenue, avec un coefficient de variation respectivement de $r = 0.37$ et $r = 0.41$ pour BT11 et BD11. Ces relations seront exploitées avec une analyse de variance ANOVA. Pour les trois variables IA, Erg et TCTB, les analyses de la variance ont montré des résultats hautement significatifs pour le facteur 1 (variété), facteur 2 (isolat) et l'interaction $F1 * F2$ ($p < 0.0001$).

La variabilité entre blocs n'est pas significative, ce qui laisse suggérer que les blocs sont homogènes. Chaque isolat et variété ont un effet significatif sur (IA), (Erg) et l'accumulation des toxines TCTB. L'indice d'attaque (IA) s'est avéré un bon indicateur d'agressivité des isolats et de l'impact de leur développement au niveau de la graine (la biomasse fongique est représentée par l'indice de l'ergostérol (Erg) et de leur production de toxines au niveau des grains de blé. En ce qui concerne les essais témoins, nos résultats indiquent seulement une très faible contamination naturelle pour la variété Vitron en 2012. Les niveaux d'ergostérol fongique se situaient en dessous du seuil de détection de notre méthode, alors qu'en 2013 l'ergostérol fongique de *F. culmorum* s'est avéré plus élevé pour les variétés Vitron et HD1220.

Tableau 15: Répartition des isolats en groupes homogènes selon l'analyse CMM de l'IA (test de Keuls à 5%)

Isolats	IA	Groupes homogènes
BD11	61,418	A
BT11	59,508	A
T7 06	56,008	B
T5 06	52,691	C

Tableau 16: Répartition des isolats en groupes homogènes selon l'analyse CMM de TCTB et Erg (test de Keuls à 5%)

Isolats	TCTB	Erg	Groupes homogènes
BD11	50,059	126,791	A
BT11	37,060	83,454	B
T7 06	19,337	76,116	C
T5 06	16,770	57,603	D

Tableau 17: Résistance des huit variétés de blé vis-à-vis des isolats de *F. culmorum* DON/ADON responsables de la fusariose de l'épi

Isolats de <i>Fusari</i>				BT11			BD11		
Nom	année	espèce	Indice	IA % ±ET	Erg µg/g ±ET	DON µg/g ±ET	IA % ±ET	Erg µg/g ±ET	DON µg/g ±ET
ARZ	2012	BT	R	27.94 (±1.87)	41.19 (±1.13)	22.57 (±1.81)	28.96(±1.98)	43.65(±5.40)	28.65(±3.16)
BIDI 17	2012	BD	R/S	40.67 (±1.15)	28.18 (±2.55)	10.75 (±0.29)	57.17(±2.57)	64.25(±4.35)	30.47 (±4.07)
MBB	2012	BD	R/S	50.07 (±0.90)	31.73 (±2.89)	26.66 (±1.41)	57.00(±2.65)	68.75(±6.54)	31.95(±1.88)
FLORENCE.A	2012	BT	R/S	50.22 (±2.01)	37.48 (±2.88)	21.38 (±2.27)	57.00(±3.00)	69.64(±2.10)	41.26(±2.95)
HD1220	2012	BT	S	61.87 (±2.27)	53.72 (±3.05)	29.22 (±4.51)	60.81(±2.55)	86.83(±2.75)	62.43(±5.46)
MAHOW.D	2012	BT	S	72.40 (±5.79)	84.74 (±8.89)	71.34 (±4.21)	69.67(±4.51)	79.56(±11.06)	83.06(±1.36)
VITRON	2012	BD	S	77.80 (±2.55)	80.49 (±5.27)	87.05 (±7.29)	74.78(±4.67)	144.98(±5.04)	142.99(±14.53)
CHEN's	2012	BD	S	69.10 (±0.85)	102.48 (±3.52)	33.51 (±2.76)	72.77(±2.54)	152.37(±6.13)	52.33(±2.65)
ARZ	2013	BT	R	40.27 (±2.91)	62.01 (±8.84)	20.50 (±0.86)	43.95(±3.35)	63.50(±8.84)	23.00(±2.52)
MBB	2013	BD	R/S	45.29 (±4.67)	69.35 (±3.07)	25.08 (±2.80)	55.13(±4.85)	123.47(±3.07)	40.36(±3.26)
BIDI 17	2013	BD	R/S	47.87 (±2.32)	52.37(±1.96)	30.20 (±3.72)	50.87(±3.87)	93.81(±1.96)	35.60(±1.06)
FLORENCE.A	2013	BT	R/S	48.10 (±2.52)	59.63 (±7.85)	31.21 (±4.69)	46.77(±3.40)	83.38(±7.85)	36.80(±2.91)
MAHOW.D	2013	BT	S	60.27 (±4.91)	84.71 (±12.91)	37.74 (±2.28)	66.61(±3.23)	112.26(±12.91)	56.75 (±5.76)
HD1220	2013	BT	S	71.17 (±3.40)	89.95 (±8.99)	50.11 (±6.79)	70.73(±3.99)	150.74(±8.99)	78.12 (±15.21)
VITRON	2013	BD	S	79.77 (±0.87)	87.70 (±6.51)	72.00 (±1.50)	86.97 (±7.51)	153.25(±6.51)	84.95(±8.13)
CHEN's	2013	BD	S	83.34 (±6.13)	161.92 (±24.52)	29.64 (±3.46)	70.32 (±4.75)	233.90(±24.52)	44.95(±3.08)

BT = Blé tendre, **BD** = Blé Dur, **Indice** : indice d'évaluation de la résistance selon le catalogue Algérien= résistant, R/S =modérément résistant S= sensible; **IA** = Indice d'attaque; **Erg** = Indice de l'Ergosterol (µg/g); **DON** = deoxynivalenol + 3 acetyl deoxynivalenol;

Tableau 18: Resistance des huit variétés de blé vis-à-vis des isolats de *F. culmorum* NIV/FX responsables de la fusariose de l'épi

Isolats de <i>Fusarium</i>				T5 06			T7 06		
Name	Année	Espèces	Indice	IA% ±ET	ERG µg/g ±ET	NIV µg/g	IA% ±Et	Eerg µg/g ±Et	NIV µg/g ±Et
ARZ	2012	SW	R	27.67 (±2.52)	23.68 (±1.32)	6.90 (±1.41)	30.99 (±1.16)	28.00 (±2.84)	8.32 (±0.77)
BIDI 17	2012	DW	R/S	37.09 (±1.72)	24.72 (±1.25)	5.09 (±0.26)	36.57 (±1.36)	21.96 (±1.96)	8.34 (±1.88)
MBB	2012	DW	R/S	40.43 (±0.59)	31.92 (±1.64)	7.41 (±1.71)	42.00 (±2.65)	47.75 (±2.33)	5.80 (±0.72)
FLORENCE A	2012	SW	R/S	36.43 (±2.23)	28.17 (±1.95)	5.21 (±0.53)	40.51 (±2.48)	28.86 (±1.17)	7.52 (±0.94)
HD1220	2012	SW	S	42.77 (±2.04)	27.97 (±2.08)	7.12 (±1.33)	55.53 (±0.85)	41.33 (±3.71)	13.04 (±1.21)
MAHOW.D	2012	SW	S	45.43 (±0.75)	30.53 (±0.65)	9.28 (±0.83)	64.67 (±1.53)	59.83 (±1.58)	16.48 (±2.66)
VITRON	2012	DW	S	61.70 (±2.86)	75.60 (±4.50)	15.88 (±1.91)	71.33 (±3.21)	85.37 (±5.06)	29.70 (±4.03)
CHEN's	2012	DW	S	62.44 (±3.60)	77.60 (±2.45)	10.58 (±2.57)	78.74 (±1.56)	111.97 (±2.14)	29.02 (±2.16)
ARZ	2013	SW	R	34.50 (±1.90)	33.62 (±2.40)	8.85 (±0.07)	36.48 (±3.08)	38.35 (±3.02)	10.94 (±0.87)
MBB	2013	DW	R/S	45.03 (±4.95)	39.00 (±2.14)	10.32 (±0.41)	49.20 (±0.92)	72.60 (±6.17)	12.96 (±0.91)
BIDI 17	2013	DW	R/S	41.22 (±3.39)	34.18 (±1.12)	9.10 (±1.43)	46.20 (±1.99)	32.96 (±5.45)	8.99 (±0.36)
FLORENCE.A	2013	SW	R/S	43.71 (±1.64)	41.51 (±1.79)	9.22 (±0.26)	46.17 (±4.40)	38.24 (±5.81)	10.53 (±0.56)
MAHOW.D	2013	SW	S	49.66 (±0.78)	35.42 (±0.74)	14.68 (±0.25)	60.17 (±5.20)	72.06 (±6.83)	17.70 (±0.33)
HD1220	2013	SW	S	59.85 (±2.29)	48.67 (±2.90)	13.92 (±0.41)	58.03 (±2.30)	54.94 (±6.00)	17.43 (±1.49)
VITRON	2013	DW	S	76.25 (±3.81)	113.62 (±4.55)	43.10 (±3.07)	75.15 (±4.83)	121.55 (±12.13)	42.11 (±3.96)
CHEN's	2013	DW	S	71.42 (±3.60)	114.80 (±5.27)	24.97 (±2.57)	76.67 (±2.89)	178.23 (±16.41)	34.05 (±2.52)

NIV = nivalenol + FX. Les variétés sont arbitrairement en ordre selon l'indice d'attaque obtenu avec BT11 sauf pour Chen's qui a été classée en 2012 et 2013 dans la dernière position en se basant sur Erg.

3.3.3. Sensibilité des variétés de blé à la fusariose de l'épi

3.3.3.1. Evaluation de la sévérité des symptômes sur épis

Au cours de cet essai, la sensibilité de quatre variétés de blé dur et 4 variétés de blé tendre à la fusariose de l'épi a été étudiée vis à vis des quatre souches de *F. culmorum* de chémotype DON et NIV. Ce test a été conduit au stade floraison, en plein champ et les épis ont été inoculés par pulvérisation au moyen d'une suspension sporale.

Les résultats de cet essai nous permettent de constater que toutes les variétés testées ont montré des symptômes d'attaque par la fusariose de l'épi signifiant leur sensibilité vis-à-vis de cette maladie. Au cours de ce test, le pourcentage des épillets attaqués par épi a été calculé pour chaque variété sur 100 épis pré-identifiés; les valeurs obtenues constituent les et les indices d'attaque (IA%) représentés au niveau des tableaux 17 et 18. L'objectif de cette inoculation *in vivo* est d'établir un classement de ces variétés commerciales de blé, selon le pourcentage d'épis infectés par *F. culmorum* en conditions naturelles.

Les résultats obtenus montrent que les variétés testées ont des niveaux d'infection différents, indiquant que ces variétés n'ont pas le même niveau de résistance. Pour les quatre isolats, l'indice d'attaque varie de 27.67% pour Arz avec l'isolat T5 06 en 2012 à 87% pour Vitron avec l'isolat BD11 en 2013 (voir tableau 17 et 18) (Fig. 28). Toutefois ils présentent généralement le même classement des variétés en se basant sur l'indice d'attaque. Les variétés de blé dur Vitron et Chen's ont des indices de sévérité les plus élevés pour les deux années, mais l'IA s'est avéré plus élevé en 2013, comparativement à l'année 2012.

Les tests de Newman-Keuls ont classé la variété Vitron comme la variété la plus sensible à l'infection à l'égard de la fusariose de l'épi avec une moyenne d'indice d'attaque de 79,5%, suivie des variétés Chen's, HD1220 et Mahon Demias et enfin, Arz qui a enregistré la plus faible moyenne d'indice d'attaque de 38,8%. (Tabl. 19). Si on se réfère à l'évaluation visuelle des symptômes, il semblerait qu'elle peut nous induire à l'erreur et elle n'est pas toujours complètement représentative de l'invasion du champignon.

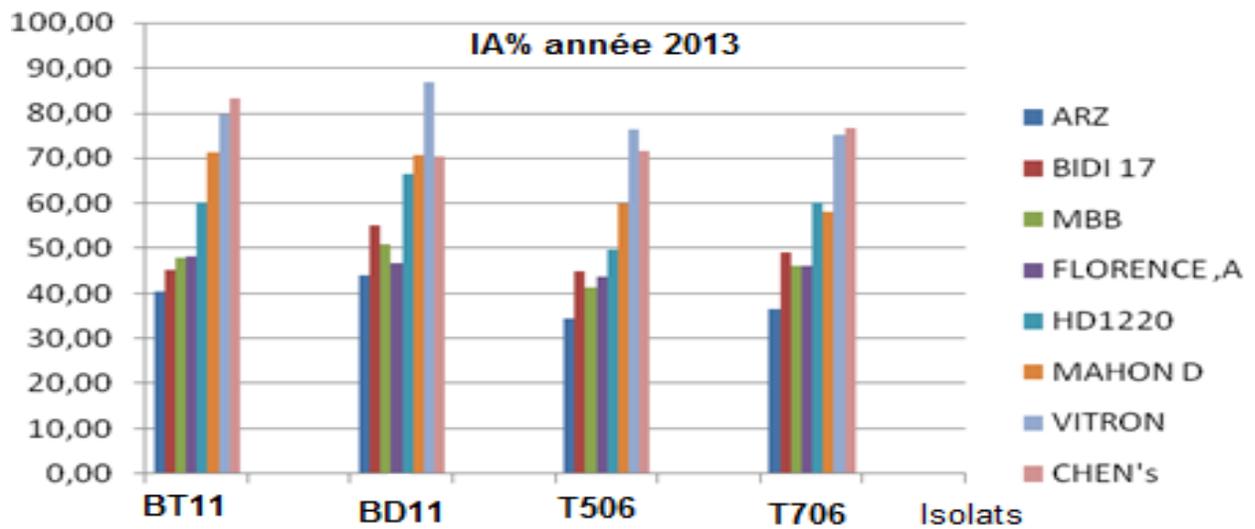
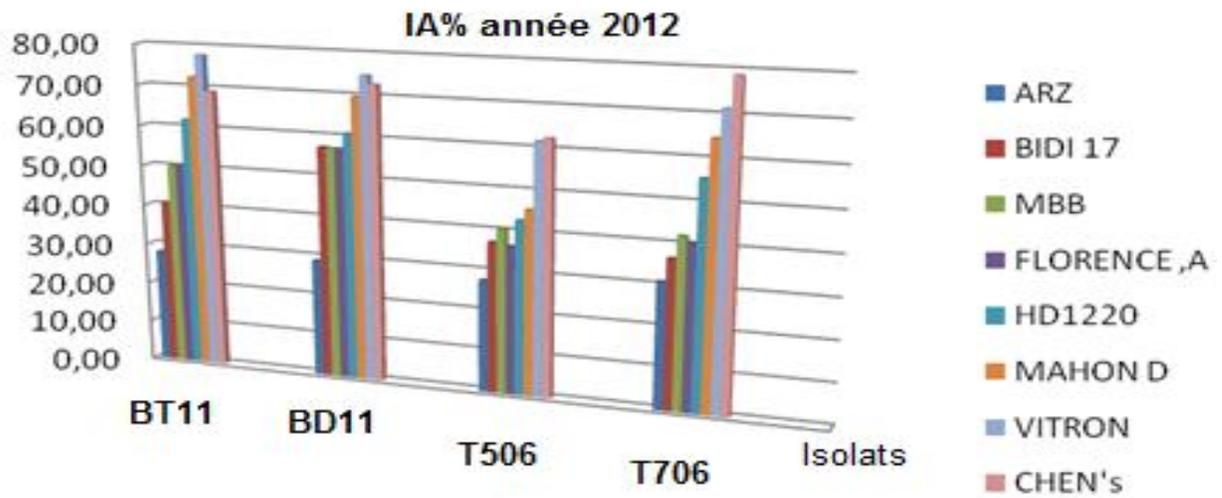


Figure 28: Pourcentage des indices d'attaque en 2012 et 2013
 Chaque histogramme représente la moyenne de trois répétitions

Dans le but de comparer la sensibilité des variétés, il serait certainement indispensable de comparer les niveaux d'ADN ou bien l'ergostérol fongique contenus dans les épis considérés dans leur totalité, tel que rapporté par Seitz et *al.* (1977).

Tableau 19: Classification des variétés testées en groupes homogènes selon Le test de Newman-Keuls en se basant sur l'indice d'attaque.

Variété	Moyenne IA	Groupes homogènes
VITRON	79,503	A
CHEN's	75,438	B
HD1220	64,946	C
MAHOW D	59,178	D
MBB	48,664	E
BIDI17	46,538	E
FLORENCE	46,185	E
ARZ	38,799	F

3.3.3.2. Quantification de l'ADN fongique de *F. culmorum* dans les grains fusariés

Pour apprécier le développement fongique de *F. culmorum* sur les épis de blé des différentes variétés, nous avons utilisé la technique de la PCR quantitative avec des amorces gène-spécifiques, afin de quantifier l'ADN de *F. culmorum*. Pour une meilleure évaluation de l'ADN fongique, nous nous sommes attachés à réaliser une quantification relative. Nous avons ramené la quantité d'ADN fongique à la quantité d'ADN de blé après avoir ajusté les ADN de tous les échantillons à 20 ng/μl d'ADN total.

L'établissement d'une courbe standard avec une bonne efficacité est important. En effet, l'efficacité de la courbe standard utilisée permet une bonne évaluation des concentrations en ADN cible de nos échantillons. Pour valider cette optimisation, une gamme étalon a été établie avec la souche INRA 268 (*F. culmorum*) productrice de 3 ADON. Les cinq points de gamme vont de 20 ng/μL à 0,002 ng/μL. L'efficacité obtenue pour cette amplification est de 1,968 (erreur de 0,0374). Tous les points de gamme sont définis, le dernier à 0,002 ng/μl a un Cp de 30. Nous avons donc une sensibilité qui va jusqu'à 0,002 ng/μl (Fig. 29).

Les différences de rendement d'extraction entre les différents échantillons et les valeurs CP enregistrées dans le rapport Light Cycler Software, montrent que le gène *Tri5* a été amplifié et s'est exprimé dans les 96 échantillons de farine de blé contaminés par les quatre souches de *F. culmorum* de chémotype DON et NIV, avec cependant des différences de rendement d'extraction entre les différents échantillons. Les valeurs de TM enregistrées ont varié entre 85,52 et 86,75 C°.

Sur la figure 31 sont reportés les niveaux d'ADN de *F. culmorum* quantifiés dans les épis des huit variétés à maturité, en condition de contamination artificielle. Il apparaît clairement sur cette figure que les variétés Vitron et Chen's sont celles qui correspondent au développement mycélien le plus important en 2012, ce qui confirme leur sensibilité encore une fois dans notre expérimentation. Les résultats montrent aussi que, les concentrations en teneurs d'ADN des *F. culmorum* DON sont largement supérieures à celles des *F. culmorum* de chémotype NIV. En ce qui concerne les essais témoins, nos résultats montrent seulement une très faible contamination naturelle pour la variété Vitron en 2012, puisque les niveaux d'ADN fongique se situaient en dessous du seuil de détection de notre méthode.

Au cours de notre étude, nous avons remarqué au sein des répétitions d'un même essai des développements d'ADN fongique différents en fonction de la variété. Cependant les résultats obtenus témoignent d'un comportement très intéressant des huit variétés inoculées. Les épis sont caractérisés par des niveaux d'ADN fongiques différents et nous avons pu constater que les isolats DON ont présenté une biomasse fongique importante par rapport aux isolats NIV.

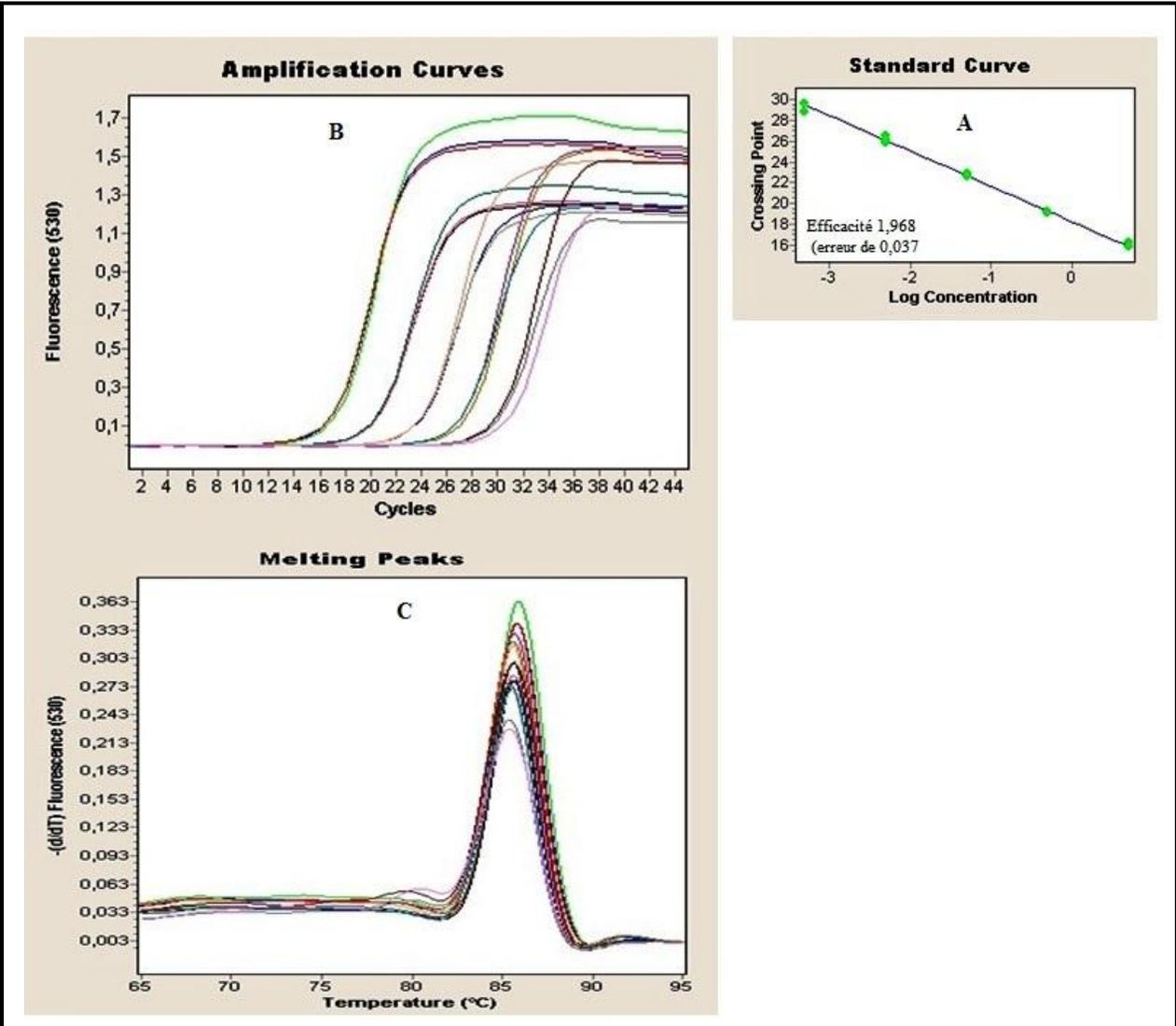


Figure 29: Gamme étalon pour la quantification du gène *Tri5* au niveau des échantillons de farine de blé contaminés par TCTB. A: La courbe standard retenue pour la quantification de l'ADN de nos échantillons; B: Courbe d'amplification qui permet de déterminer le crossing point (Cp); C: Courbe de fusion : $-(d/dt) \text{ fluorescence} = f(\text{température})$

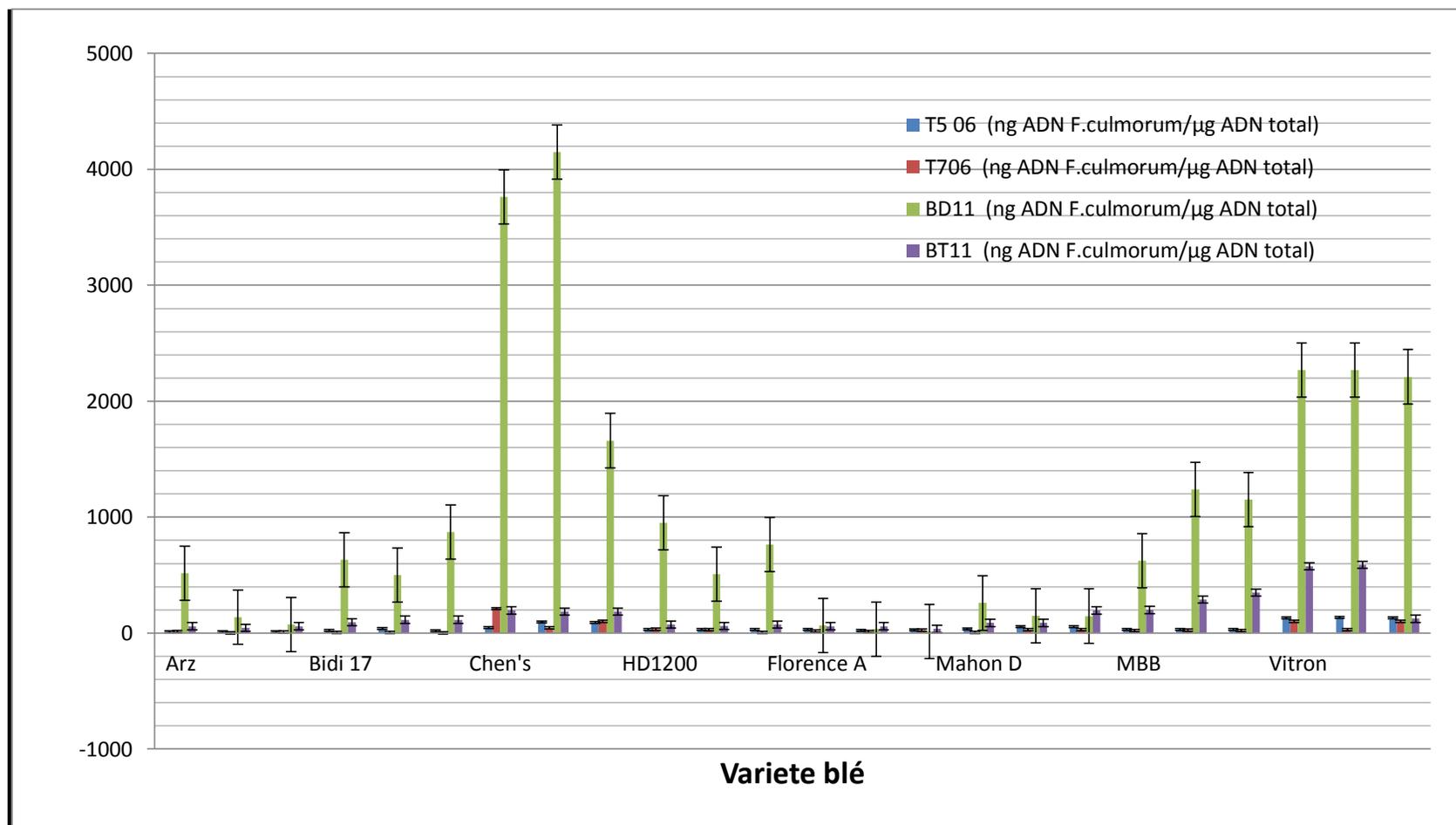


Figure 30. ADN de quatre souches de *F. culmorum* des huit variétés testées en 2012

L'hétérogénéité entre répétitions biologiques des résultats obtenus pour certains échantillons, nous laisse douter de l'efficacité de cette analyse pour nos essais en plein champ. Aussi étant une technique qui coûte très chère vu le nombre des échantillons à analyser, nous avons jugé judicieux de quantifier la biomasse fongique dans nos grains contaminés par des analyses d'extraction et quantifier l'ergostérol par HPLC/UV pour les deux années 2012 et 2013.

Étant donné que les quantifications d'ADN par PCR -Q ont été faites uniquement pour les échantillons de l'année 2012, l'interprétation des résultats du développement fongique sera basée uniquement sur les résultats de l'ergostérol.

3.3.3.3. Quantification de l'ergostérol fongique contenu dans les grains

Nous avons réalisé des analyses d'extraction et des quantifications d'ergostérol sur tous les échantillons des deux années 2012 et 2013. Les résultats sont représentés comme indice d'ergostérol (Erg) dans les tableaux 17 et 18. La teneur en ergostérol s'est avérée être plus élevée en 2013 comparativement à 2012. Cette infection importante corrobore les degrés d'IA% calculés et il apparaît que les conditions environnementales humides de l'année 2013 ont été plus propices au développement de l'infection.

Pour la classification des variétés, le test de Newman-Keuls montre que la variété Chen's a présenté un taux d'ergostérol (Erg) le plus élevé, suivi par Vitron, puis la variété Arz, Bidi 17 et Florence qui ont montré un faible taux (Erg). Une concentration plus élevée d'ergostérol a été trouvée dans les deux variétés de blé dur introduites telles les variétés Vitron et Chen,s. Ce sont celles qui correspondent au développement mycélien le plus important et peuvent être considérées, encore une fois dans notre expérimentation, comme les variétés les plus sensibles (Fig. 31).

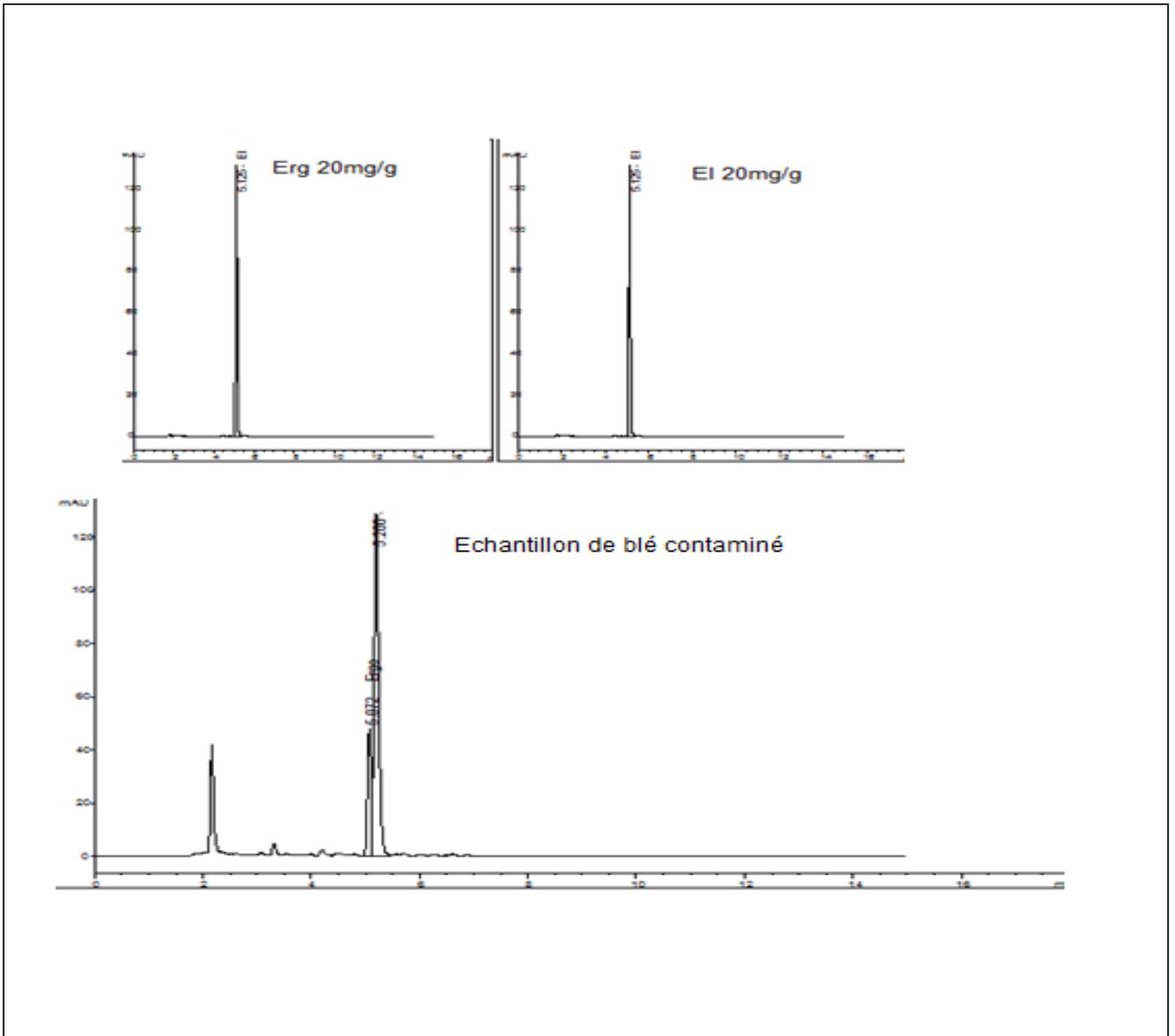


Figure 31: Analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC/UV) de l'ergostérol de la variété Chen's contaminée par *F. culmorum*

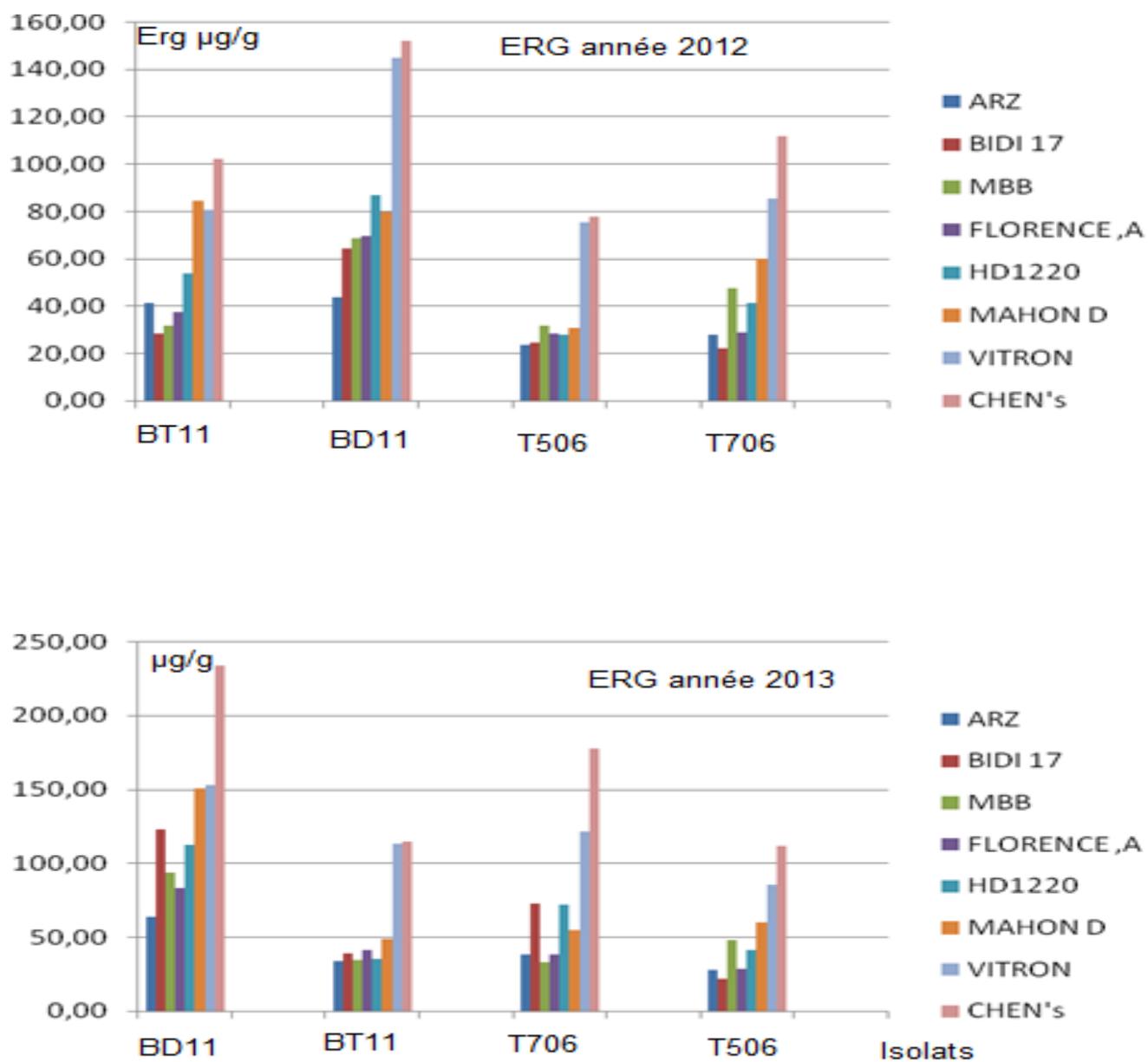


Figure 32: Biomasse fongique des quatre isolats de *F. culmorum* exprimée par la teneur en l'ergostérol chez les variétés de blé récoltées 2012 et 2013.

Les résultats montrent aussi clairement qu'en général, le blé tendre est plus résistant que le blé dur en termes de développement mycélien. La variété introduite de blé tendre Arz a montré une meilleure tolérance. Elle a présenté des niveaux faibles d'ergostérol de *F. culmorum* dans ses épis récoltés en 2012 et 2013, avec les quatre souches utilisées (Fig. 32). Les deux variétés autochtones de blé dur Bidi17 et MBB se sont montrées également moins sensibles par rapport aux autres variétés de blé dur et tendre.

Même si les niveaux de l'ergostérol et l'IA sont sensiblement différents entre les deux années 2012 et 2013, le classement reste à peu près identique pour ces deux critères. Seulement la variété Chen's s'est comportée différemment durant les deux années, montrant le plus fort indice d'ergostérol chaque année, mais avec un IA sensiblement plus faible en 2012 avec la souche BT11. Dans le cas contraire, il est aussi remarquable que l'ordre reste plus ou moins le même, quelle que soit la souche de *F. culmorum*. Il semble aussi qu'en général, les variétés introduites Vitron et Chen's sont plus sensibles à la fusariose que les variétés autochtones MBB et Bidi17.

3.3.3.4. Accumulation des trichothécènes dans les grains

Afin d'avoir une vision complète de l'incidence de la fusariose, nous avons également analysé les toxines accumulées dans les grains. En fonction de la souche, les deux types de trichothécènes B soit DON ou NIV ont été dosés dans tous les échantillons. Cependant, des niveaux tout à fait différents ont été observés, en fonction de la souche utilisée, de la variété considérée et de l'année (Fig. 33).

Aucun FX n'a été détecté pour les échantillons inoculés avec les souches de chémotypes NIV. La forme acétylée de DON (3-ADON) n'a pas été observée dans tous les échantillons inoculés avec les souches de chémotypes DON/3-ADON et lorsqu'elle est présente, elle n'a été détectée qu'à de très faibles valeurs.

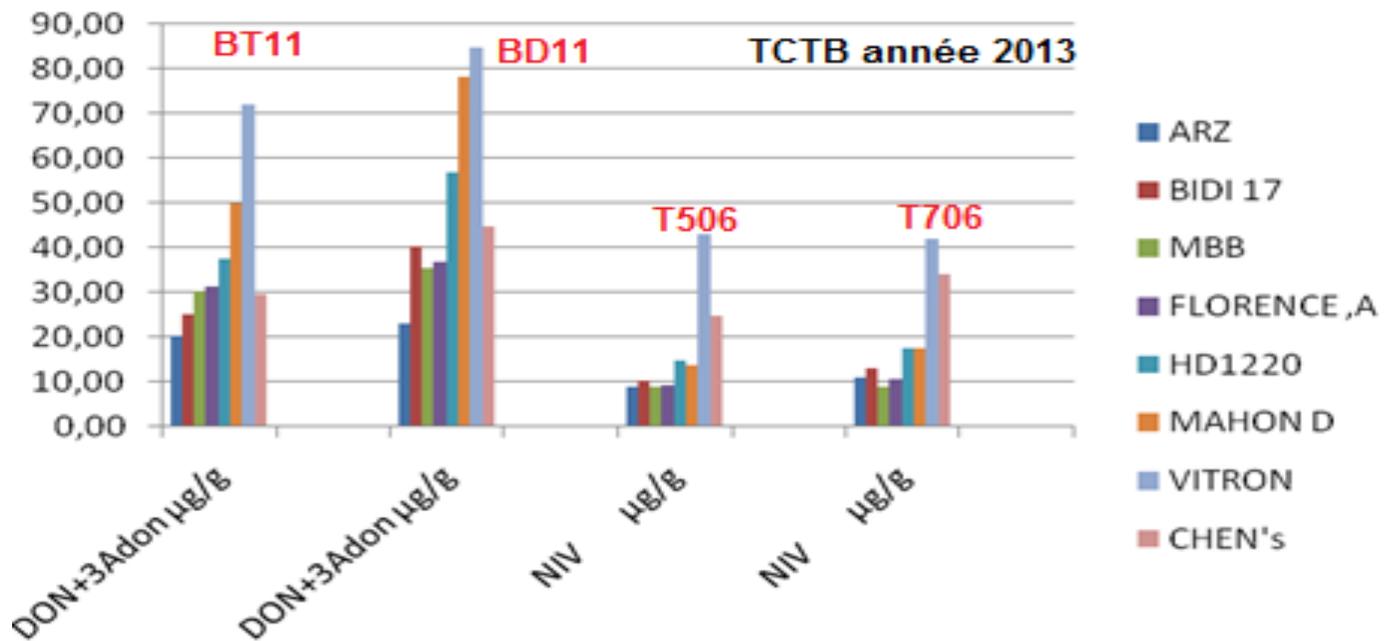
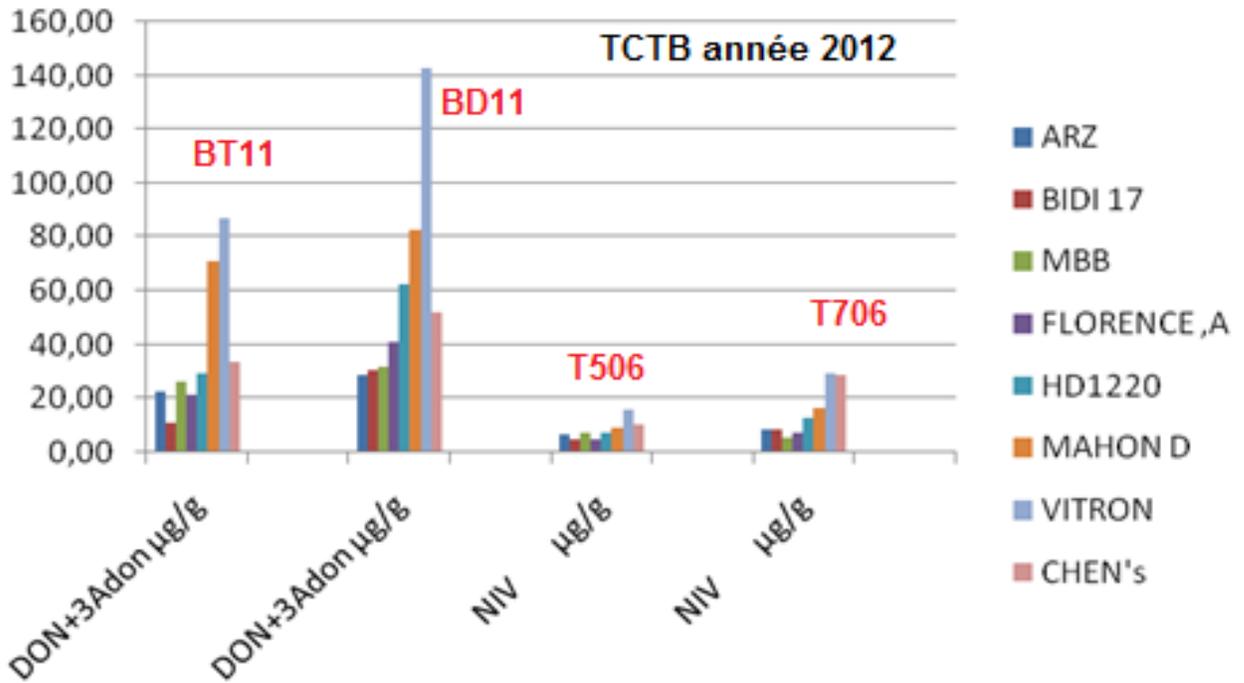


Figure 33: Teneur en TCTB chez les variétés de blé récoltées en 2012 et 2013

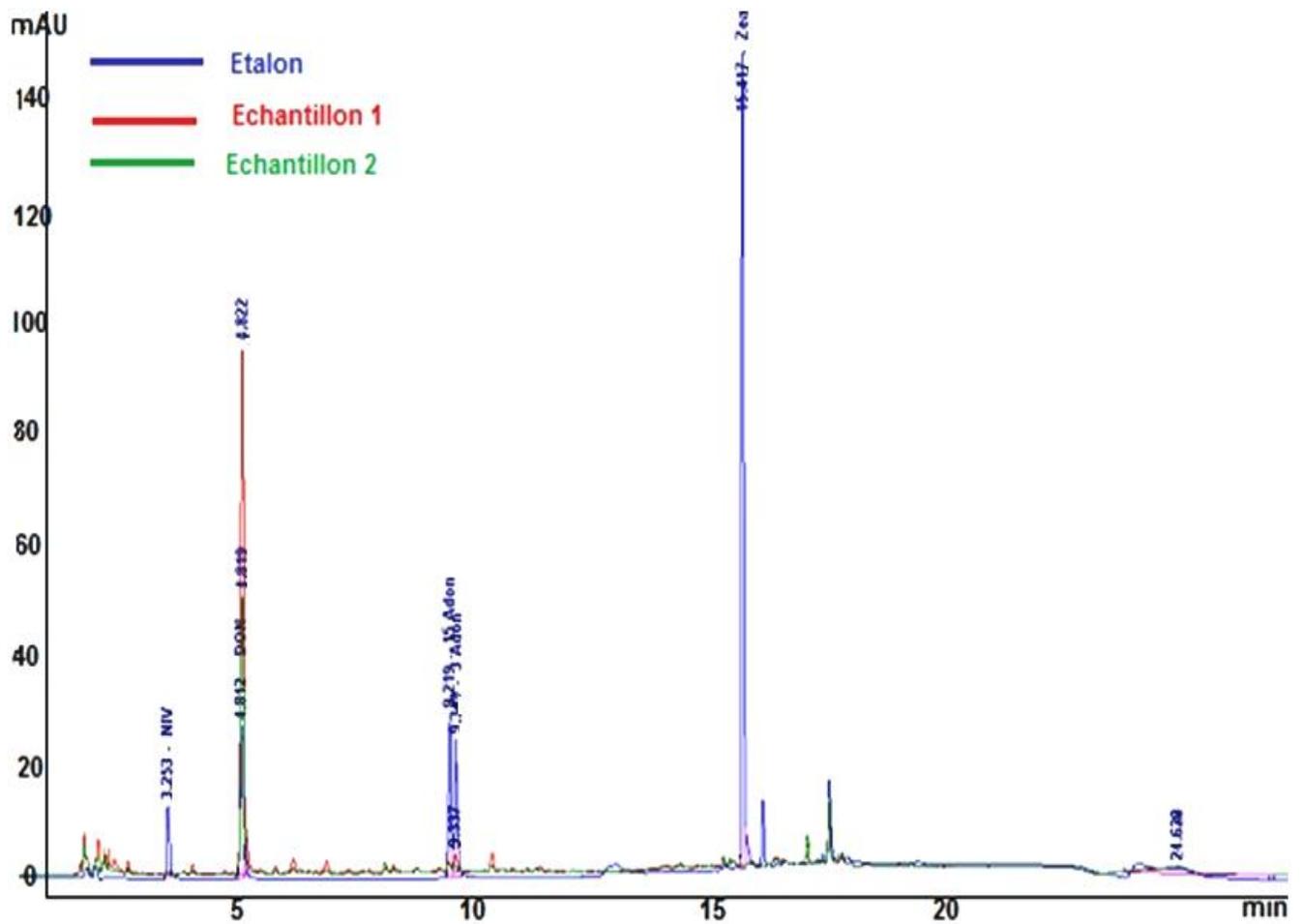


Figure 34: Analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC/DAD) de deux échantillons de blé "Vitron et HD1200" contaminés par *F. culmorum* producteur de DON/3ADON.

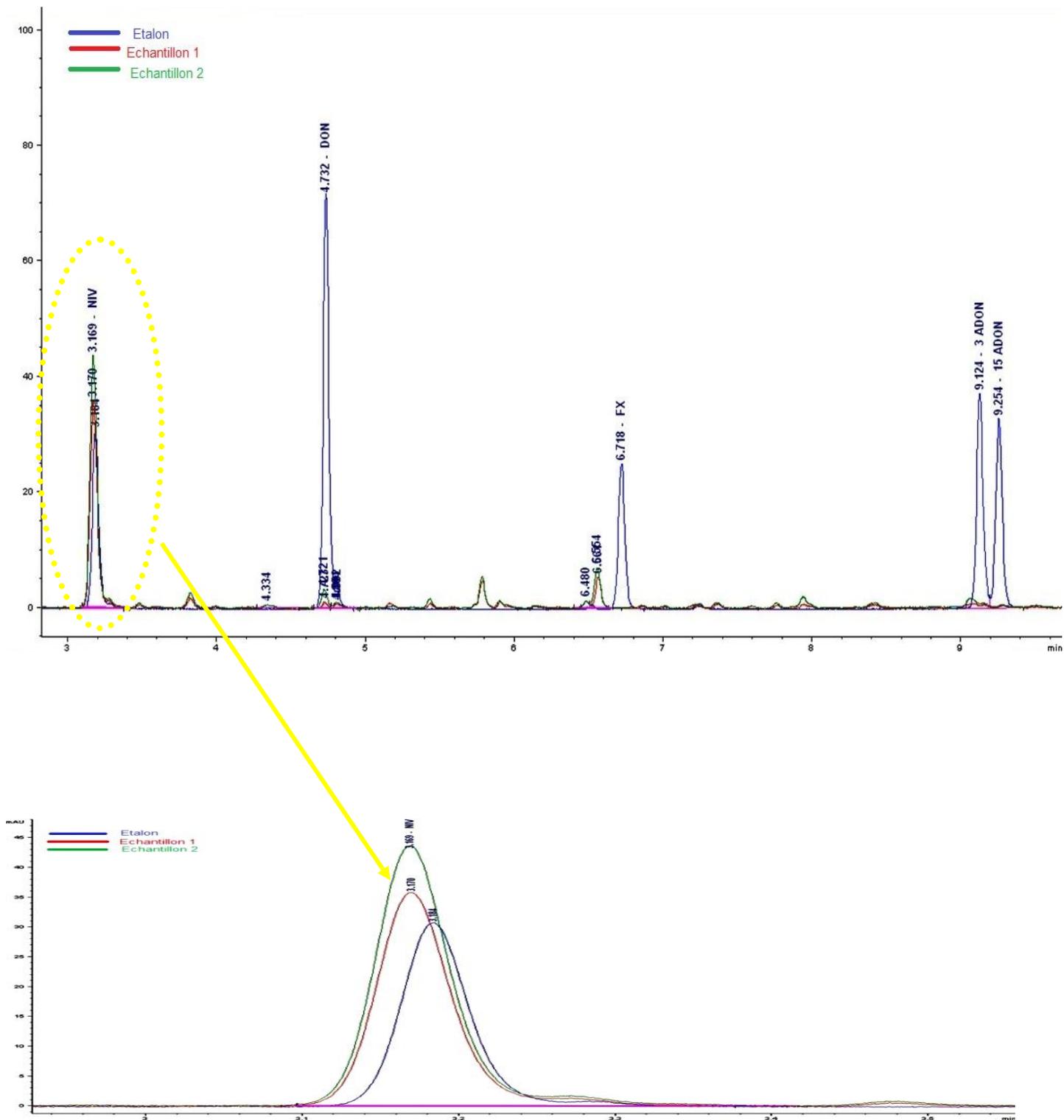


Figure 35: Dosage de la quantité de NIV par chromatographie en phase liquide (HPLC/DAD) de deux échantillons de blé "Vitron et HD1200" contaminés par *F. culmorum* producteur de NIV/FX.

Dans le tableau 16, les valeurs de DON représentent la somme de DON + 3-ADON. Les deux souches de *F. culmorum* BT11 et BD11 produisent des quantités élevées de la zéaralénone dans l'essai in vitro, mais les quantités de ZEA était plutôt faible dans les tests de plein champ et limitée à seulement quelques échantillons de blé en 2013. Pour cette raison, le résultat de dosage de ZEA n'a pas été examiné dans cette étude pour les essais en plein champ.

Dans l'ensemble, en termes d'accumulation des trichothécènes dans les grains, les deux années de l'expérimentation peuvent être considérées comme deux années très favorables. Même si elles ont montré des différences dans les degrés d'attaque (IA) ou le développement mycélien (Erg), les différences dans l'accumulation des toxines dans les variétés sont assez semblables pour les deux années et cette dernière reflète généralement les degrés d'indice d'attaque et la quantité de l'ergostérol.

Cependant, des différences assez fortes ont été trouvées entre les isolats dans leur potentiel toxigène. Les deux isolats BD11 et BT11 de DON/3-ADON produisent des niveaux significativement plus élevés de toxine (à partir d'environ 21 µg/g à environ 115 µg/g) que les deux isolats NIV/FX (à partir d'environ 2 µg/g à 42 µg/g de toxines). Les tests de Newman-Keuls ont classé la variété Vitron comme la variété qui a accumulé le plus de TCTB, suivie des variétés HD1220, Chen's, Mahon Demias et enfin, Arz qui a accumulé la plus faible concentration en TCTB (Fig. 34) et (Fig. 35).

La classification des variétés basées sur la quantité de toxines n'a pas changé par rapport à la classification avec l'indice d'attaque et l'ergostérol sauf pour la variété de blé dur Chen's. Étonnamment, Chen's est la variété la plus sensible en terme de contamination par le *Fusarium* tel que mesuré par le niveau de l'ergostérol, mais elle accumule de façon étonnante, une teneur en trichothécène significativement plus faible avec les quatre souches fongiques.

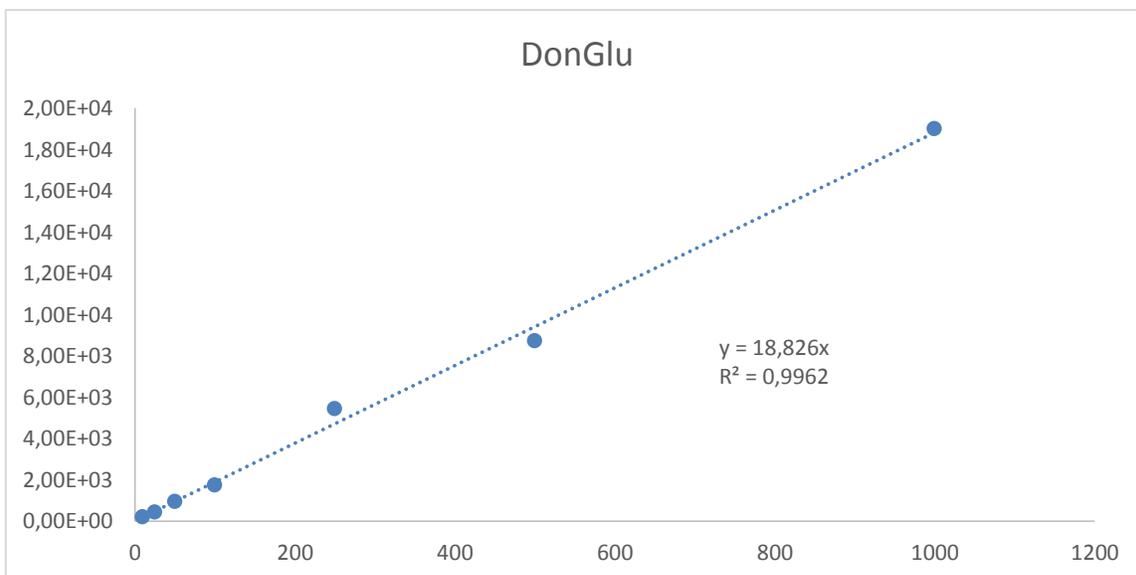


Figure 36 : Analyse de l' Analyte Peak Height (cps) par HPLC-MS/MS

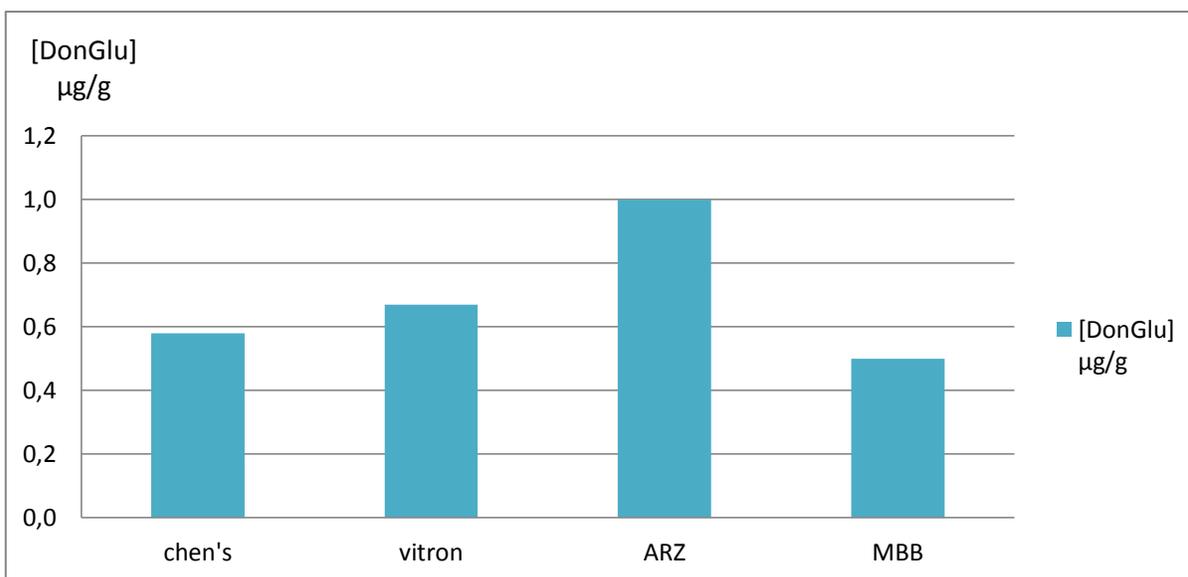


Figure 37: Quantité de DON-Glu en µg/g accumulée au niveau de quatre variétés de blé significative ($p < 0,004$) beaucoup moins de toxine que Vitron.

En effet Chen's montre une quantité d'ergostérol la plus élevée (233,9 µg/g) avec BT11 en 2013 et le contenu de DON est seulement environ 40 µg/g, soit plus de 2 fois moins que l'autre variété sensible Vitron, qui affiche une valeur de DON et d'ergostérol environ de 80 µg/g et 153.35 µg/g respectivement. Ce comportement est confirmé par les résultats obtenus avec les trois autres souches de *F. culmorum* et ce pour les 2 années. Concernant les ratios pour DON/Erg ou NIV/Erg, le génotype sensible Chen's a une valeur toujours significativement plus faible que les variétés résistantes. Il est apparu clairement pour Chen's, que les niveaux d'ADN et d'ergosterol conséquents quantifiés dans les stades tardifs de remplissage du grain ne s'accompagnaient pas de niveaux importants de toxines. Cette observation suggère fortement l'existence dans les grains de la variété Chen's, de facteurs endogènes susceptibles de moduler la toxinogénèse de *F. culmorum*.

3.3.3.5. Quantification du DON-Glucoside

Il a été montré que chez des variétés résistantes, le DON est efficacement transformé en forme glycosylée DON-Glucoside (DON-Glu) (Berthiller et al., 2005, Poppenberger et al., 2003). Afin de déterminer si la teneur plus faible en DON observée chez la variété Chen's pourrait s'expliquer par une transformation efficace du DON en DON-Glu. Nous avons choisi alors d'axer notre analyse du DON-Glu sur les variétés Arz; MBB; Chen's ayant montré une certaine tolérance à l'accumulation de TCTB et les comparer à une variété sensible Vitron, ces échantillons proviennent de l'essai inoculé avec BD11 en 2013. Les résultats ont montré que Chen's a accumulé seulement 0.58 µg/g de DON-Glu par rapport à Vitron (0,67 µg/g) et MBB (0,5 µg/g). Cette moindre accumulation de DON-Glu chez Chen's ne pourrait expliquer la plus faible accumulation de DON chez cette dernière. Cependant Arz contient environ deux fois plus DON-Glucoside que les autres variétés (1,0 µg/g) (Fig. 36 et 37).

3.3.4. Analyse en Composantes Principales appliquée aux grains contaminés par *Fusarium*.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour étudier les corrélations entre les paramètres analysés (IA, Erg et TCTB) et les échantillons de grains issus des huit variétés de blé au stade maturité des deux années 2012 et 2013. L'ACP est une présentation optimale d'un tableau « variables-individus » où les colonnes sont des variables et les lignes des individus. Les angles entre variables s'interprètent comme des corrélations et la proximité des individus comme des similitudes globales de valeurs observées (Lebart et *al.*, 1995).

L'ACP a été réalisée sur 16 échantillons et trois variables qui sont les indices d'attaque, les teneurs en ergostérol de *F. culmorum* et les teneurs en TCTB. Les deux premières composantes principales rassemblent 95,53 % de la variance totale. La figure 39 montre la contribution des variables aux deux premiers axes F1 et F2 qui représentent 78.63% et 15.90% de la variance totale.

Cette ACP montre la répartition des variétés pour les deux années d'expérimentation ainsi qu'une très forte corrélation entre les variables par rapport à la première composante F1. Elle met en opposition la zone 1 qui regroupe toutes les variétés sensibles et la zone 2 qui représente les variétés les plus résistantes. Les coordonnées sur F1 montrent que le comportement des variétés est semblable pour 2012 et 2013, à l'exception de la variété HD1220 qui a changé de position entre les deux années. Cette dernière variété se retrouve dans la zone 2 en 2012 avec un IA élevé et une accumulation importante de toxine, ce qui explique sa position dans la zone 1 en 2013. La variété Chen's se différencie des autres variétés dans l'axe F2 probablement par le niveau sensiblement inférieur des toxines accumulées pour cette variété, même si l'IA est élevé, tel que mentionné précédemment.

Encore une fois en général, le blé dur est plus sensible que le blé tendre pour l'accumulation des toxines telles qu'il a été observé pour l'IA et l'Erg.

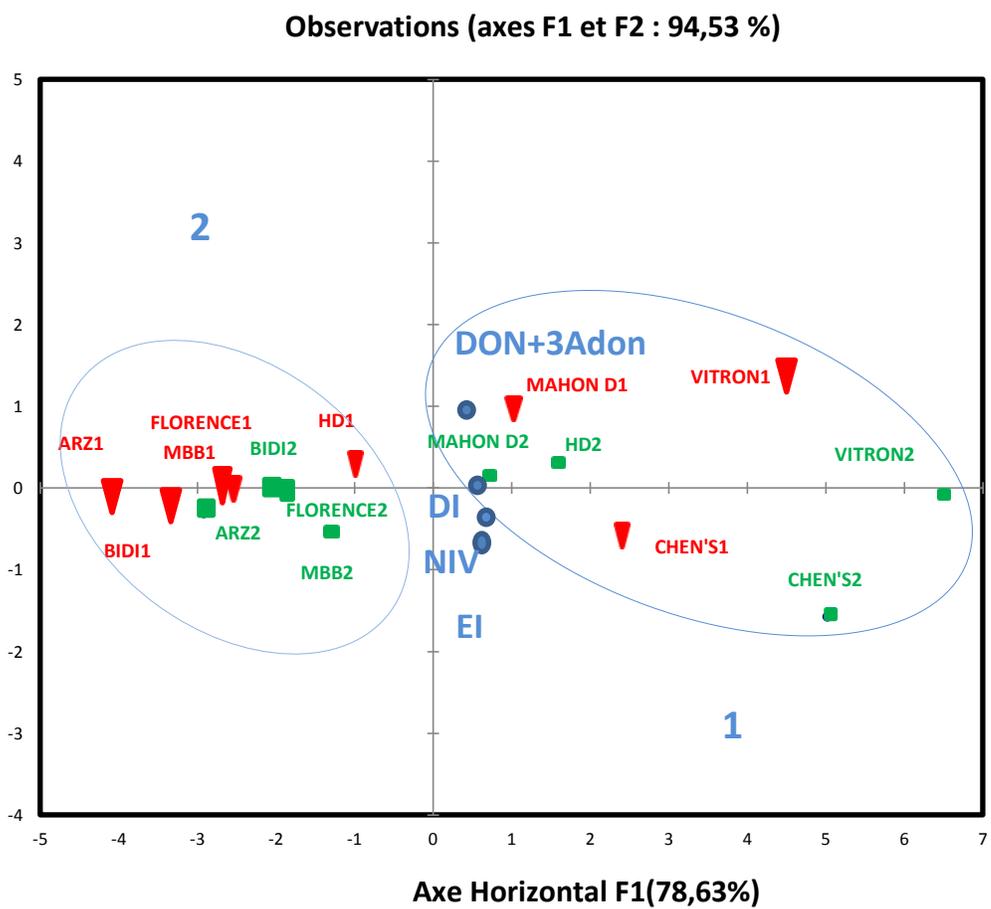


Figure 38: Corrélation entre les variables et les échantillons sur les axes définis par deux composantes F1 et F2

Cependant, la variété de blé dur Bidi 17 a montré une résistance à l'accumulation des toxines et au développement fongique semblable à la variété la moins sensible de blé tendre Arz. La figure 38 montre aussi que la variétés de blé tendre introduite Arz et les variétés de blé dur autochtones Bidi 17 et MBB semblent moins sensibles à *F. culmorum* que la variété autochtone Mahon Demias pour le blé tendre et les variétés introduites Vitron et Chen's pour le blé dur. Les deux années d'expérimentation ont conduit à un (IA) légèrement différent, mais elles donnent des résultats très similaires pour le classement des variétés pour la résistance à la fusariose.

3.3.5. Evaluation de la résistance du nouveau matériel génétique

Au cours de l'année 2013, en parallèle aux huit variétés testées, un nouveau matériel génétique a été évalué avec la souche T5 06. Sur la base de cette expérience unique, les résultats présentés dans le tableau 20 montrent que les deux variétés parentales de blé dur parental peuvent aussi être considérées comme un matériel sensible à l'infection de la fusariose et l'accumulation des TCTB.

On peut remarquer que le parent G10 se comporte comme Chen's, qui a montré un niveau élevé d'ergostérol et de l'indice d'attaque mais une tolérance relative à la contamination de toxines comparée à Vitron. Nous avons noté un fait intéressant, pour les deux lignées G1 et G4 qui se sont comportées comme un matériel résistant en terme d'accumulation de toxines et d'indice d'attaque (Tabl. 20). En particulier, G4 a présenté de meilleures caractéristiques que Arz le meilleur blé tendre testé présentant le plus haut niveau de résistance (Fig. 39).

Dans ce test, nous avons noté que G4 a un indice d'attaque de 25.33% et une faible biomasse fongique de 30.21 µg/g ainsi que des niveaux très bas de toxine ont été détectés de toxines de l'ordre de 2,04 µg/g. Effectivement, G4 a un ratio NIV/Erg inférieur de G1 et trois à huit fois inférieurs que n'importe lequel des autres variétés testées dans le dosage de 2013.



Figure 39 : Comportement variétal différent de G4 et G9 vis à vis de *F. culmorum*
(A) Symptômes typiques de la fusariose de l'épi; (B) Symptômes de FHB sur variété sensible; (C) Symptômes de FHB sur variété tolérante.

Tableau 20: Evaluation des lignées de blé dur G1 et G4 en comparaison avec les variétés utilisées en Algérie

Génotype	Espèces	IA% (+ET)	Erg µg/g (+ET)	NIV µg/g (+ET)	NIV/Erg Ratio
G4 F14 lignée 4	BD	25.33 (0.31)	30.21 (2.03)	2.04 (0.30)	0.07
Arz	BT	34.50 (1.90)	33.62 (2.40)	8.85 (0.07)	0.26
G1 F14 lignée 1	BD	36.67 (2.89)	63.99 (1.76)	8.78 (1.06)	0.14
Bidi 17	BD	41.22 (3.39)	34.18 (1.12)	9.10 (0.43)	0.27
Florence Aurore	BT	43.71 (1.64)	41.51 (1.79)	9.22 (0.26)	0.22
MB B	BD	45.03 (4.95)	39.00 (2.14)	10.32 (0.41)	0.26
Mahow Démiás	BT	49.66 (0.78)	35.42 (0.74)	14.68 (0.25)	0.41
HD1220	BT	59.85 (2.29)	48.67 (2.90)	13.92 (0.41)	0.29
Chen's	BD	71.42 (3.60)	114.80 (5.27)	24.97 (2.57)	0.22
G10 (Parent 1-G4)	BD	73.67 (1.53)	128.72 (1.53)	24.16 (1.90)	0.19
Vitron	BD	76.25 (3.81)	113.62 (4.55)	43.10 (3.07)	0.38
G9 (Parent 2-G4)	BD	78.33 (2.89)	144.89 (5.24)	34.11 (4.36)	0.24

L'essai a été réalisé en 2013 avec l'isolat de *F. culmorum* T5 06; la classification a été basée sur l'IA%.

3.3.6. Caractérisation de la composition en acides phénoliques liés des grains de blé

Les acides phénoliques, composés omniprésents des céréales, ont fait l'objet d'un certain nombre d'études concernant leur implication dans les mécanismes de défense des plantes contre les espèces du genre *Fusarium*. Dans des travaux précédents, menés *in vitro*, le rôle inhibiteur de l'acide férulique vis-à-vis de la synthèse de TCTB a été démontré (Pinson-Gadais *et al.*, 2007 et Boutigny *et al.*, 2009) ainsi que celui d'extraits naturels d'acides phénoliques issus de sons de blé (Boutigny *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent nous laissent émettre l'hypothèse est que cette différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines, serait liée à des compositions biochimiques différentes des variétés de blé et lignées testées et/ou à l'existence de composés capables d'interférer avec la mycotoxinogenèse de *Fusarium*.

3.3.6.1. Quels sont les acides phénoliques liés présents dans les grains de blé ?

Des échantillons témoins de grains des variétés et lignées de blé provenant des essais réalisés en plein champ en 2012 et 2013 ont servi à cette analyse; leur récolte a été effectuée 23 jours après la floraison. Nous avons choisi dans ce présent travail, d'orienter notre analyse sur les acides phénoliques liés, car le contenu en acides phénoliques libres diminue à maturité. McCallum et Walker (1991) ont observé deux "pools" de synthèse d'acide férulique soluble au début et à la fin de l'état laiteux du grain, suivi par une diminution du contenu en acide férulique soluble à maturité.

Sur la figure 40 sont reportés deux profils chromatographiques obtenus à 320 nm (Longueur d'onde d'absorption maximale des dérivés cinnamiques) caractéristiques de la composition en acides phénoliques liés dans des grains obtenus au cours de notre expérimentation. Le premier acide composé qui est de loin le plus abondant est l'acide férulique, représente jusqu'à 90 % de la teneur totale en composés phénoliques monomères.

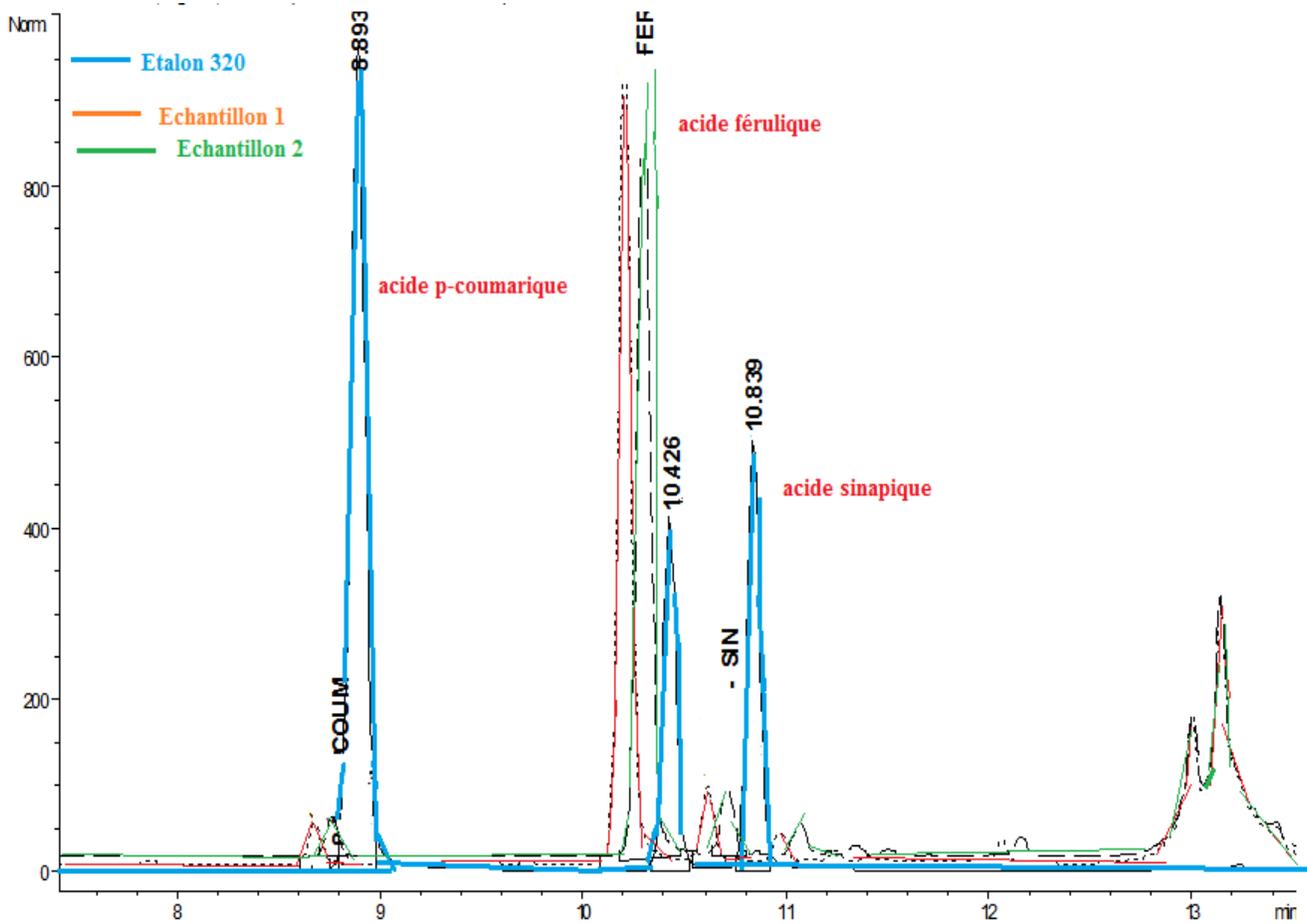


Figure 40: Profil chromatographique des acides phénoliques liés de la variété blé dur Chen's et la lignée G

Tableau 21 : Contenu en acide cinnamic dérivé de l'acide phénolique mesuré dans les grains des différentes variétés

Les acides phénoliques contenus dans les grains matures ($\mu\text{g}/\text{gr}$)						
Variétés et lignées	Ferulic $\pm\text{SD}$	Sinapic $\pm\text{SD}$	<i>p</i> -coumaric $\pm\text{SD}$	Vanillic $\pm\text{SD}$	Vanillin $\pm\text{SD}$	4-hydro benzoi c $\pm\text{SD}$
Chen's	1636 (± 26.52)	216 (± 6.37)	28 (± 2.90)	13 (± 1.51)	16 (± 2.94)	3 (± 0.13)
Florence	1438 (± 5.74)	151 (± 28.78)	57 (± 4.27)	0	1 (± 0.04)	0
G1	1126 (± 7.07)	150 (± 5.60)	42 (± 1.56)	nd	nd	Nd
Bidi17	1035 (± 28.41)	93 (± 1.53)	32 (± 1.46)	18 (± 1.47)	28 (± 4.26)	6 (± 0.07)
G4	988 (± 11.31)	133 (± 8.40)	54 (± 2.83)	0	0	0
Mahon Démias	780 (± 1.12)	110 (± 1.41)	11 (± 0.28)	0	32 (± 2.83)	12 (± 1.14)
MBB	763 (± 17.15)	158 (± 16.97)	32 (± 1.41)	12 (± 0.14)	8 (± 0.13)	19 (± 1.56)
G10(Parent1 G4)	730 (± 12.73)	76 (± 3.01)	22 (± 2.83)	nd	nd	Nd
Arz	730 (± 15.50)	67 (± 4.24)	50 (± 1.41)	0	0	0
G9 Parent2 G4	555 (± 14.28)	107 (± 6.92)	46 (± 4.24)	nd	nd	Nd
Vitron	483 (± 14.14)	69 (± 2.83)	3 (± 0.57)	20 (± 1.41)	16 (± 1.50)	13 (± 1.41)
HD1220	52 (± 0.10)	46 (± 1.46)	2 (± 0.13)	11 (± 0.04)	16 (± 4.34)	12 (± 1.46)

Le second était l'acide sinapique suivie par l'acide p-coumarique. L'acide benzoïque dérivé de l'acide vanillique, et l'acide P-hydroxybenzoïque et vanilline ont aussi été détectés mais ne sont présents qu'à l'état de trace (Fig. 41). Les résultats trouvés au cours de cette étude sont aussi en accord avec les travaux de Tunali *et al.* (2006). Boutigny (2007) a détecté dans les grains de deux variétés les acides férulique, p-coumarique, la vanilline et la vanillique. Pour ces deux variétés, l'acide férulique est l'acide phénolique insoluble lié aux parois largement majoritaires et représente de 94% à 99% des acides phénoliques insolubles liés aux parois totaux et ce à tous les stades de développement des grains. Des variations qualitatives des contenus en acides phénoliques ont déjà été observées au cours de la maturation des grains de blé (McKeehen *et al.*, 1999).

Nos résultats ont montré que la teneur en acides phénoliques varie considérablement d'une variété à l'autre (d'environ 52 µg/g dans HD1220 à 1 636 µg/g au niveau de Chen's pour l'acide férulique) (Tabl. 21). Par ailleurs, il a été montré que les compositions en acides phénoliques des grains varient selon les variétés de blé (Regnier et Macheix, 1996; Lempereur *et al.*, 1997; Lempereur *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2006; Mpofo *et al.*, 2006). Dans notre étude, il y a une tendance vers le fait que les variétés et les lignées telles que Chen's, Florence, G1 et G4, ayant une teneur plus élevée en acide férulique, sont celles qui ont le plus faible ratio NIV/Erg.

Une ACP a été réalisée sur les huit variétés, les deux lignées avec les deux parents et quatre variables qui sont les indices d'attaque, les teneurs en acide férulique et acide sinapique ainsi que les teneurs en NIV et DON/3ADON. La figure 42 montre la contribution des variables aux deux premiers axes qui représentent 49,76 et 15,90 de la variance totale. La première composante montre une forte corrélation entre l'acide sinapique et l'acide férulique. Cette corrélation s'explique par les échantillons qui ont une grande quantité en acides phénoliques mais sont à la fois moyennement à faiblement contaminés en TCTB (zone 1) en opposition avec les échantillons très contaminés en TCTB et qui ont moyennement à faiblement teneurs d'acides phénoliques (zone 2). La deuxième composante montre une forte corrélation entre TCTB.

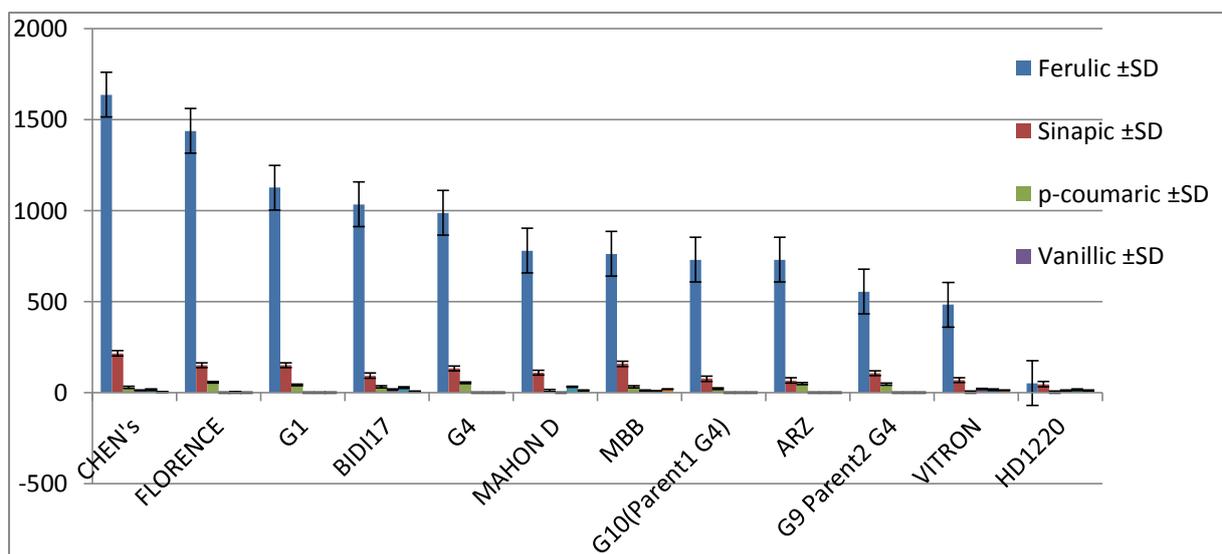


Figure 41: Contenu en acide phénolique mesuré dans les grains

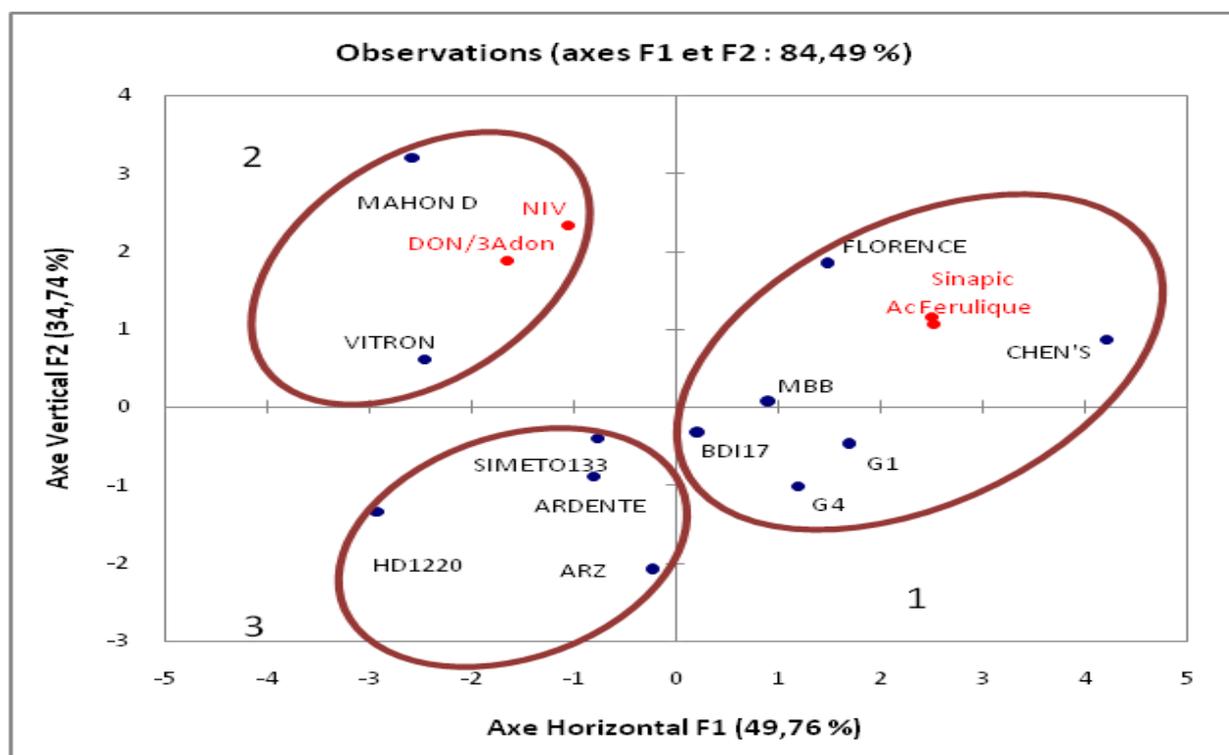


Figure 42: Repartition des variétés sur les deux axes F1 et F2 en corrélation avec les variables acides phénoliques et TCTB

Les acides phénoliques liés contribuent à l'intégrité et à la stabilité des parois. Les parois riches en acides phénoliques liés de certaines variétés de blé pourraient alors limiter l'infection des grains par *Fusarium*. Ainsi, ces résultats constituent des données préliminaires compte tenu qu'une seule extraction des acides phénoliques liés a pu être réalisée sur les grains. Il conviendrait de multiplier les extractions et de considérer un plus grand nombre de variétés afin de conclure ou pas sur l'implication des acides phénoliques liés dans la résistance à l'accumulation de mycotoxines.

Des perspectives intéressantes seraient de réaliser des cinétiques plus précises du remplissage des grains infectés ou non en acides phénoliques sur des variétés de sensibilité différente à l'accumulation de mycotoxines et non d'effectuer seulement une analyse à 23 jours après l'infection.

3.3.7. Discussion

La question que nous avons abordé dans ce chapitre concernait la capacité des souches algériennes de *F. culmorum* à causer la fusariose de l'épi et à produire des toxines dans les grains de blé dans nos conditions locales. L'étude visait également à évaluer le niveau de tolérance à la fusariose des variétés les plus utilisées en Algérie pour la production de blé.

Notre expérimentation, pour les deux années 2012 et 2013 s'est traduite par un développement fongique et des symptômes conséquents associés à une production de toxines significative qui nous permet d'apporter plusieurs éléments de réponse. Les caractéristiques (sporulation, agressivité, potentiel toxigène) des 4 souches de *F. culmorum* de chémotypes DON/3 ADON et NIV/FX) choisies pour l'inoculation artificielle, sont un des éléments de cet objectif.

Tout d'abord, en se basant sur l'indice d'attaque et l'ergosterol, nous avons trouvé des niveaux élevés de sévérité pour les deux souches de DON/3-ADON. Cependant les deux autres souches NIV/FX se sont avérées un peu moins virulentes en terme de symptômes et de développement fongique. Aussi en fonction de la variété, des accumulations faibles de trichothécènes ont été détectées de 5 à 10 fois moins que les souches de DON/3-ADON. Les résultats de l'étude de l'agressivité des quatre souches de *F. culmorum* DON et NIV nous ont

permis de mettre en évidence un effet principal de l'isolat sur chaque variable de sévérité mesurée. Ces effets principaux de l'isolat ont également été mis en évidence par Alvarez *et al.* (2010) qui ont montré des différences d'agressivité (AUDPC) entre souches de la même espèce. Cet effet chémotype a aussi été mis en évidence par Gosman *et al.* (2010) et largement décrit pour *F. culmorum* (Miedaner *et al.*, 2001, Wegulo, 2012), également observé pour les espèces *F. graminearum* (Mirocha *et al.*, 1994) et *F. asiaticum* (Zhang *et al.*, 2012, Shen *et al.*, 2012), avec une propagation plus lente des souches de chémotype NIV dans l'épi.

Cependant, en terme de symptômes, la différence de l'agressivité entre les deux chémotypes reste modérée dans nos expériences par rapport à ce qui a été rapporté dans la littérature, en suggérant que nos deux souches NIV algériennes sont assez agressives. Les données pour les deux années 2012-2013 appuient fortement une corrélation étroite entre le niveau de production des trichothécènes et les symptômes, observés lorsque chacun des deux chémotypes est considéré à part. Cette corrélation est encore plus forte entre la quantité de toxines et le développement de ce champignon dans le grain, tel que mesuré par l'indice de l'ergostérol.

Des travaux comparables antérieurs ont été rapportés par Miller *et al.* (1985) et plus récemment par d'autres auteurs (Mirocha *et al.*, 1994, Perkowski *et al.*, 1996, Miedaner *et al.*, 2000), qui avaient montré que plus l'indice d'attaque est élevé, plus le développement fongique est important et la quantité de toxines accumulées dans les grains est élevée. Cela semble être la règle dans le cas de nos échantillons et cette variabilité dans le développement et la production de toxines est clairement due à un effet variété, excepté faite pour la variété de blé dur Chen's.

Cette dernière variété témoigne d'un comportement très intéressant. Ses épis sont caractérisés par des niveaux d'ergostérol fongiques similaires ou même supérieurs à Vitron et à ceux des autres variétés sensibles. Mais de façon étonnante, la teneur en trichothécènes accumulée est significativement plus faible avec les quatre souches fongiques. On peut alors émettre l'hypothèse que la variété Chen's possède des propriétés qui limitent la production de TCTB par *F. culmorum* sans pour autant affecter son développement lors de son cycle d'infection.

L'existence de sensibilités différentes à l'accumulation de mycotoxines au sein des variétés de blé dur disponibles est connue (Favre *et al.*, 2004). Une résistance à l'accumulation de trichothécènes a été déjà discutée (Boutigny *et al.*, 2008; Boutigny *et al.*, 2010). Deux principales raisons peuvent expliquer un tel résultat : i) la mycotoxine est produite mais modifiée par une transformation métabolique aboutissant à sa "détoxification". La glycosylation, qui permet une détoxification des mycotoxines, est un processus qui existe naturellement chez certaines variétés de blé; ii) l'accumulation des mycotoxines reste limitée en raison d'une inhibition de leur biosynthèse par des composés endogènes des grains (Boutigny *et al.*, 2008; Boutigny *et al.*, 2014). Il a été démontré que, dans certaines variétés résistantes, le DON est efficacement transformé par la plante en une forme glycosylée DON-Glucoside (DON-Glu) (Berthiller *et al.*, 2005b; Poppenberger *et al.*, 2003).

Cependant, dans notre cas, la faible teneur en DON observée chez la variété Chen's en 2013 ne pourrait pas s'expliquer par une transformation efficace du DON en DON-Glu; le contenu du DON-Glu pour Chen's apparaît semblable à celui de Vitron ou MBB. La présence des composés biochimiques de la plante à effets inhibiteurs en concentrations maximales au moment où le champignon produit ses toxines, pourrait expliquer une faible biosynthèse de DON (Boutigny *et al.*, 2008; Miller et Arnison, 1986a).

Nos résultats apportent une première évaluation des variétés de blé utilisées en Algérie pour la tolérance à la fusariose causée par des souches locales de *Fusarium*. Les huit variétés ont en effet montré, après inoculation, de sérieuses différences concernant le degré d'infection par *F. culmorum* (résistance de type II) et l'accumulation en TCTB (résistance de type V). En considérant nos résultats dans les conditions climatiques algériennes, la classification des variétés des moins sensibles aux plus sensibles peut s'établir comme suit: Arz(BT)+Bidi(BD)+MBB(BD)>>Florence(BT)>HD1220(BT)>MahonDémias(BT)>Vitron(BD)>Chen's(BD).

Ces résultats montrent que globalement, le blé dur est plus sensible à *F. culmorum* que le blé tendre; ils sont en accord avec la tendance généralement admise que le blé dur est plus sensible que le blé tendre à la fusariose causée par des espèces telles que le *F. graminearum* ou *F. culmorum* (Buerstmayr *et al.*, 2009 et Lionetti, 2015).

Le classement a été établi en se basant sur les résultats obtenus dans les essais d'inoculation artificielle. Il semblerait ainsi que les deux variétés autochtones de blé dur Bidi17 et MBB possèderaient une meilleure résistance que les autres variétés. A l'inverse, pour les variétés de blé dur introduites Vitron et Chen's elles se sont comportées comme un matériel très sensible.

Une conclusion générale qui peut être émise de cette étude est qu'avant d'introduire une variété de blé et la cultiver à grande échelle dans une zone climatique donnée, il serait judicieux d'évaluer au préalable sa résistance à la fusariose dans ces conditions climatiques. Nous pensons que les variétés autochtones de blé dur Bidi17 et MBB se sont mieux adaptées aux conditions climatiques semi-arides ou aux souches fongiques locales, que nous avons utilisées dans nos essais. Toutefois, en règle générale, aucune résistance significative n'a jamais été observée pour le blé dur (Buerstmayr et *al.*, 2009).

Par ailleurs, la faible sensibilité de certaines variétés, que nous avons observées dans nos essais peut-être incertaine. Ceci devrait être aussi modulé par le fait que les variétés de blé tendre utilisées dans nos essais sont celles cultivées en Algérie. Ces variétés ne sont pas connues à ce jour, comme étant les meilleures variétés résistantes à la fusariose disponibles dans le monde. Il devrait être utile d'introduire un matériel résistant de référence à ces tests en plein champ pour avoir une bonne référence, et pour une meilleure classification de résistance.

Toutefois parmi les variétés locales cultivées traditionnellement, Arz pour le blé tendre; Bidi 17 et MBB pour le blé dur semblent être les meilleures. Mais, les deux nouvelles lignées de blé dur développées récemment à l'ENSA EL Harrach et testées en 2013 ont montré des caractéristiques plus intéressantes sur le plan sensibilité et accumulation de toxines. []

Nos données ont permis de suggérer une certaine résistance pour ces deux lignées en 2013. En effet elles ont présenté des concentrations en TCTB et des niveaux d'ergosterol de *F. culmorum* très faibles dans leurs épis récoltés avec de loin le plus faible ratio NIV/Erg, et un indice d'attaque très faible avec la souche T5 06 productrice de NIV. En particulier la lignée G4 s'est démarquée par des concentrations très faibles en TCTB de l'ordre du microgramme par gramme de matière sèche de grain. Ces teneurs très faibles

pour une inoculation artificielle associée aux faibles quantités d'ergostérol de *F. culmorum* et un faible indice d'attaque, suggèrent une bonne résistance de la lignée G4 vis-à-vis de la fusariose et l'accumulation de TCTB produits par *F. culmorum*. Les deux lignées G4 et G1 ont été retenues parmi d'autres lignées pour leur comportement intéressant dans les essais d'inoculation artificielle. Cependant ces résultats restent encore préliminaires et l'analyse des lignées qui n'a été réalisée que pour 2013, indique des tendances mais demande absolument à être répété pour livrer des résultats statistiquement validés.

Les inoculations artificielles sur épi réalisées en plein champ durant deux années successives 2012 et 2013, ont permis d'évaluer que la résistance à l'infection initiale chez le blé est une **résistance de type I**. Cette méthode ne permet pas vraiment d'estimer **la résistance de type II** qui correspond à une résistance à la propagation du mycélium dans les tissus de l'hôte (Schroeder et Christensen 1963; Boutigny *et al.*, 2008). Les données obtenues semblent indiquer que ces lignées seraient tolérantes mais cela reste à confirmer par d'autres essais dans des conditions environnementales différentes et avec plusieurs souches de *Fusarium*. Il est également nécessaire à utiliser d'autres méthodes d'inoculation pour évaluer correctement leur tolérance à la fusariose. De plus, il est important de sélectionner des isolats représentatifs des différentes espèces dominantes associées à la maladie.

A ce sujet, plusieurs auteurs (Akinsanmi *et al.*, 2004 ; Mesterházy, 1984 ; Mesterházy, 1997 ; Xue *et al.*, 2004) ont insisté sur le fait d'utiliser une combinaison d'isolats pour évaluer la sensibilité, et la réaction des géotypes vis-à-vis de ces agents pathogènes. Différentes méthodes d'inoculation ont été décrites dans la littérature pour étudier la sensibilité variétale, (Brennan *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2002 ; Mesterházy, 1983; Mishra *et al.*, 2003. et Wu *et al.*, 2004). Indépendamment de ces réserves, ces résultats sont très encourageants et montrent qu'il serait possible de choisir pour le blé dur un matériel adapté à des conditions climatiques arides ou semi-arides qui montrent une tolérance à la fusariose.

Plusieurs études ont suggéré une corrélation entre le contenu en acides phénoliques (acide férulique, acide *p*-coumarique) des grains et le niveau de résistance à la fusariose chez le blé (McKeehen *et al.*, 1999 ; Siranidou *et al.*, 2002; Ponts *et al.*, 2007) et chez le maïs (Assabgui *et al.*, 1993; Pons, 2010, Ponts *et al.*, 2006). Au cours d'une étude plus récente , menées en conditions *in vitro*, le rôle inhibiteur de l'acide férulique vis-à-vis de la synthèse de TCTB a été démontré (Boutigny *et al.*, 2009) ainsi que celui d'extraits naturels

d'acides phénoliques issus de sons de blé décrit comme un inhibiteur fort de la production de DON/3-ADON *in vitro* (Boutigny *et al.*, 2010). L'acide férulique est généralement beaucoup plus abondant dans le grain de blé dur et cela suggère son implication dans la résistance à l'accumulation des trichothécènes dans la plante (Boutigny *et al.*, 2009, Boutigny *et al.*, 2008; Ponts *et al.*, 2011).

Nos résultats de l'analyse des acides phénoliques, en 2013, ont montré que parmi les acides phénoliques liés, l'acide férulique est de loin la forme majoritaire (90 % de la teneur totale en formes monomériques d'acides phénoliques). Cette prépondérance a déjà été rapportée par Kim *et al.*, (2006). Il convient de noter que les données obtenues ont permis de mettre en évidence la très grande richesse de la variété Chen's en acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique, en particulier l'acide férulique et l'acide sinapique. Cela semble cohérent avec l'effet inhibiteur des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamiques (Ponts *et al.*, 2011) et l'accumulation limitée des trichothécènes dans cette variété. Rappelons que Chen's a accumulé des niveaux limités de TCTB en 2012 et 2013.

Cette observation s'appliquerait également pour les lignées G1 et G4, mais pour les deux autres variétés Florence Aurore et Bidi 17 qui présentent également une teneur élevée en acide férulique, aucun effet évident n'a été observé sur une faible accumulation de toxines. Toutefois, il convient de noter que la teneur en acide phénolique a été déterminée dans les grains à maturité. L'accumulation des composés phénoliques varient énormément lors du remplissage du grain et généralement au cours premiers stades de remplissage du grain; le niveau est le plus élevé tel qu'il a été illustré chez le maïs (Atanasova-Penichon *et al.*, 2012).

Cet effet inhibiteur significatif attendu sur la modulation de l'accumulation des trichothécènes, dépendrait essentiellement des teneurs en acides phénoliques pendant la période de l'envahissement du grain par le champignon, juste après l'inoculation. Au cours de l'infection, la libération des formes liées à la paroi de l'acide férulique pourrait être reliée à une inhibition de la biosynthèse des toxines. Il faudrait par la suite vérifier si ces composés sont bien libérés au premier stade de développement du grain lors d'une contamination au champ.

CONCLUSION



4. Conclusion

Les recherches menées sur l'identification des espèces fusariennes en Algérie responsables de la contamination des blés en TCTB, et la connaissance des complexes d'espèces susceptibles d'infecter les épis est essentielle pour aider les sélectionneurs à orienter leur recherche vers des variétés plus adaptées pour un meilleur comportement aux espèces responsables de la fusariose de l'épi.

Nos résultats de prospection durant les trois campagnes 2011-2013 et 2014 ont effectivement mis en évidence la présence des agents responsables de la fusariose de l'épi du blé dans toutes les régions céréalières prospectées : Nord, Ouest, Est et Sud. L'identification morphologique des agents responsables a permis d'identifier 7 espèces à savoir : *F. culmorum*, *M. nivale*, *F. pseudograminearum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* et *F. avenaceum*. Cette identification a été confirmée par PCR en utilisant des amorces spécifiques de chaque espèce fongique. Cette technique a permis de classer les isolats de *F. graminearum* dans le groupe 1 (*F. pseudograminearum*) d'une part et dans le groupe 2 (*F. graminearum*) d'autre part; l'espèce *F. pseudograminearum* est recensée pour la première fois en Algérie.

De plus, les résultats de l'enquête réalisés durant les années 2012-2013 et 2014 ont montré que *F. culmorum* est l'espèce prédominante observée en Algérie sur le blé (résultats non publiés). Toutefois, il est clair que l'équilibre d'espèces peut être selon les années. Ainsi le développement de la fusariose de l'épi devrait être évalué régulièrement dans toutes les régions céréalières en Algérie où les conditions climatiques peuvent être favorables à son développement et surtout pour les champs irrigués sous pivot.

La deuxième partie de ce travail a porté sur la capacité des isolats algériens de *F. culmorum* à produire des toxines. Nous nous sommes intéressés aussi au chémotypage et à la quantification de leur potentiel toxigène. A cet effet une caractérisation moléculaire d'une collection de 40 isolats de *F. culmorum*, a été réalisée. Les résultats ont montré que tous les isolats testés sont potentiellement toxigènes. Ainsi, l'amplification des gènes *Tri12*-3ADON et *Tri12*-NIV montrent une dominance de 95% des isolats du type DON, et seulement 5% sur les 40 isolats se sont avérés du chémotype NIV.

Ces résultats ont été confirmés par une analyse biochimique de 4 isolats de *F. culmorum*, sur la production *in vitro* en utilisant du riz comme substrat. L'analyse des profils chromatographiques, a montré que tous les isolats ont produit les quatre trichothécènes (NIV, DON, Fusarénon X (FX) et 3-ADON). Seulement deux isolats ont produit de la Zéaralenone ; il s'agit des deux isolats de chémotype DON/3-ADON qui ont montré également des niveaux bien supérieurs à ceux des deux isolats NIV/FX. Compte tenu de ces résultats, qui confirment la présence et la dominance en Algérie d'isolats de *F. culmorum* de chémotype 3-ADON, il serait intéressant de les prendre en compte lors de l'étude de l'épidémiologie de la fusariose de l'épi.

Dans le dernier volet de nos recherches ,nous avons abordé deux questions, la première concernait la capacité des isolats algériens de *F. culmorum* à causer la fusariose de l'épi et à produire dans nos conditions locales des toxines dans les grains de blé. La deuxième question était d'évaluer les variétés de blé les plus utilisées en Algérie pour leur comportement à l'égard de la fusariose. Un essai préliminaire a été réalisé en 2011 avec ces quatre isolats de *F. culmorum* qui a permis de confirmer leur pathogénéicité. Suite à ces résultats, ces quatre isolats ont été utilisés comme référence pour l'évaluation de la résistance d'une gamme de huit variétés de blé.

Les inoculations artificielles des épis réalisées en plein champ durant deux années successives 2012 et 2013,ont permis d'évaluer l'agressivité respective des quatre isolats de *F. culmorum* et la sensibilité des variétés de blé à la fusariose et l'accumulation de toxines. Les résultats de l'étude de l'agressivité des quatre souches de *F. culmorum* DON et NIV nous ont permis de mettre en évidence un effet principal de l'Isolat sur chaque variable de sévérité mesurée. Nous avons obtenu des niveaux élevés de sévérité pour les deux souches de DON/3-ADON; les deux autres isolats NIV/FX se sont avérés un peu moins virulents. Les données pour les deux années 2012-2013 appuient fortement une corrélation étroite entre le niveau de production des trichothécènes et les symptômes observés, lorsque chacun des deux chémotypes est considéré séparément. Cette corrélation est encore plus forte entre la quantité de toxine et le développement de ce champignon dans le grain, tel que évalué par l'indice de l'ergostérol.

Les résultats de comportement des variétés de blé utilisées en Algérie pour la tolérance à la fusariose causée par les isolats locaux de *F. culmorum* ont permis d'obtenir le classement suivant des moins sensibles aux variétés les plus sensibles qui s'établit comme suit: Arz(BT)+Bidi(BD)+MBB(BD)>>FlorenceAurore(BT)>HD1220(BT)>MahonDémias (BT)>Vitron(BD)>Chen's(BD). Ces résultats montrent que le blé dur est relativement plus sensible à la fusariose que le blé tendre.

Parmi ce matériel végétal testé, les deux nouvelles lignées de blé dur développées récemment à l'ENSA El Harrach et testées en 2013, ont montré des caractères intéressants. Ils ont présenté le plus faible ratio NIV/Erg, ainsi qu'un indice d'attaque très faible avec l'isolat T5 06 producteur de NIV. Les données obtenues semblent indiquer que ces lignées seraient tolérantes, mais cela reste à confirmer par d'autres essais dans des conditions climatiques différentes avec plusieurs isolats de *Fusarium* en utilisant éventuellement d'autres méthodes d'inoculation pour confirmer leur tolérance à la fusariose.

Pour expliquer les résultats du comportement variétal, les dosages effectués ont montré que la teneur en acides phénoliques varie considérablement d'une variété à l'autre. En particulier l'acide férulique était de loin le plus abondant jusqu'à 90 % de la teneur totale en composés phénoliques monomères. Il y a une tendance vers le fait que les variétés et les lignées telles que Chen's, Florence, G1 et G4, ayant une teneur plus élevée en acide férulique sont celles qui ont le plus faible ratio NIV/Erg. Ceci suggère que même pour des variétés pour lesquelles une résistance au développement fongique ne peut pas être sélectionnée, des variétés accumulant moins de mycotoxines pourraient être sélectionnées.

Une conclusion générale qui peut être tirée de cette étude, est qu'avant qu'une variété de blé ne soit introduite et cultivée à grande échelle, il est important d'évaluer sa résistance à la fusariose.

Suite à ces travaux et aux résultats obtenus, des perspectives majeures de recherche se dégagent:

En priorité d'autres analyses sur un nombre d'échantillons plus important mériterait d'être envisagées afin de confirmer nos résultats. Ces données seraient intéressantes afin de connaître quelles espèces fusariennes prédominent pour une région géographique donnée et dans quelles proportions les espèces se répartissent à travers le territoire.

Il serait également intéressant d'approfondir les recherches sur la sélection de variétés de blé résistantes à la fusariose ainsi qu'à l'accumulation de mycotoxines. Pour cela il est nécessaire d'étendre les essais dans des conditions environnementales variées afin de sélectionner des variétés largement adaptées.

Plusieurs travaux ont mis en évidence une possible corrélation entre les teneurs en acides phénoliques des grains (acide férulique et acide *p*-coumarique) et le degré de résistance à la fusariose chez le blé (Ponts et *al.*, 2005, Ponts et *al.*, 2011). Il reste que dans notre cas, nos résultats constituent des données préliminaires, compte tenu qu'une seule extraction des acides phénoliques liés, a pu être réalisée sur les grains. Il est impératif de pour suivre les extractions sur un plus grand nombre de variétés, afin de conclure ou pas sur l'implication des acides phénoliques dans la résistance à l'accumulation de mycotoxines.

Des analyses échelonnées à plusieurs stades seraient également à réaliser durant le remplissage des grains de variétés ayant une sensibilité différente à l'accumulation de mycotoxines et non pas d'effectuer seulement une analyse à 23 jours après l'infection. Il serait donc intéressant de se pencher sur l'identification et la caractérisation des composés qui pourraient être potentiellement inhibiteurs de la synthèse de toxines, et qui permettront de progresser dans la recherche de variétés résistantes à *F. culmorum* et leur limitation à l'accumulation de TCTB dans un contexte global de réduction du risque mycotoxique sur céréales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFSSA 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. .
2. AIT KAKI, Y. 1993. Contribution à l'étude des mécanismes morphophysiologiques de tolérance au stress hydrique sur 5 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.). Thèse de Magister, Université d'Annaba. P132
3. AKINSAMMI, O.A., MITTER, V., SIMPFENDORFER, S., BACKHOUSE, D. & CHAKRABORTY, S. 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. Isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research* 55: 97-107.
4. AKINSANMI, O. BACKHOUSE, D., SIMPFENDORFER, S. & CHAKRABORTY, S. 2006. Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathol.*, 55: 494-504.
5. ALASSANE-KPEMBI, I., KOLF-CLAUW, M., GAUTHIER, T., ABRAMI, R., ABIOLA, F. A., OSWALD, I. P. & PUEL, O. 2013. New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272, 191-198.
6. ALBERMANN, S., LINNEMANNSTÖNS, P. & TUDZYNSKI, B. 2013. Strategies for strain improvement in *Fusarium fujikuroi*: Overexpression and localization of key enzymes of the isoprenoid pathway and their impact on gibberellin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 2979-2995.
7. ALEXANDER, N. J. & MCCORMICK, S. P. 2004. Expression of Tri15 in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics* 45(3): 157-162.
8. ALEXANDER, N.J., MCCORMICK, S.P. & HOHN, T.M. 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics* 261: 977-984.
9. ALI DIB, T. & MONNEVEUX, P. H. 1992. Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I. Caractères morphologiques d'enracinement. *Agronomie*, 12 : 371-379.
10. ALKADRI, D., NIPOTI, P., DOLL, K., KARLOVSKY, P., PRODI, A. & PISI, A. 2013. Study of fungal colonization of wheat kernels in Syria with a focus on *Fusarium* species. *Int J Mol Sci*, 14, 5938-51.
11. ALVAREZ, C.L., AZCARATE, M.P. & PINTO, V.F. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 131-135.

12. ALVAREZ, C.L., SOMMA, S., MORETTI, A. & FERNÁNDEZ PINTO, V., 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates in wheat kernels in Argentina. *J. Phytopathol.* 158, 173–181.
13. ANDERSON, D. W., BLACK, R. M., LEE, C. G., POTTAGE, C., RICKARD, R. L., SANDFORD, M. S., WEBBER, T. D. & WILLIAMS, N. E. 1989. Structure-activity studies of trichothecenes: cytotoxicity of analogues and reaction products derived from T-2 toxin and neosolaniol. *J Med Chem*, 32, 555-62.
14. ANONYME . 1949. « Série économique : agriculture les céréales en Algérie ». Alger, Algérie: documents algériens. [en ligne]. www.algerroi.net/Alger/documents_algeriens/economique/pages/66_cereales_algerie.htm. [Page consultée Juin, 2011].
15. AOKI T., & O'DONNELL, K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91: 597-609.
16. ARGYRIS J, TEKRONY D, HERSHMAN D, VANSANFORD D, HALL M, KENNEDY B, RUCKER M, & EDGE C. 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Science* 45, 626–634.
17. ARSENIUK E., GORAL G. & CZEMBOR H.J. 1993. Reaction of triticale, wheat and rye accessions to graminaceous *Fusarium spp.* infection at the seedling and adult plant growth stages. *Euphytica*, 70, 175-183.
18. ARSENIUK E., FOREMSKA E., GORAL T. & CHELKOWSKI J. 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*, 147, 577-590.
19. ASSABGUI, R. A., REID, L. M., HAMILTON, R. I. & ARNASON, J. T. 1993. Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 83, 949-953.
20. ATANASOVA-PENICHON, V., BERNILLON, S., MARCHEGAY, G., LORNAC, A., PISON-GADAIS, L., PONTS, N., ZEHRAOUI, E., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2014. Bioguided isolation, characterization, and biotransformation by *Fusarium verticillioides* of maize kernel compounds that inhibit fumonisin production. *Mol Plant Microbe Interact*, 27, 1148-58.
21. ATANASOVA-PENICHON, V., PONS, S., PINSON-GADAIS, L., PICOT, A., MARCHEGAY, G., BONNIN-VERDAL, M. N., DUCOS, C., BARREAU, C., ROUCOLLE, J., SEHABIAGUE, P., CAROLO, P. & RICHARD-FORGET, F. 2012. Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Mol Plant Microbe Interact*, 25, 1605- 1616.

22. AUDENAERT, K., VAN BROECK, R., BEKAERT, B., DEWITTE, F., HEREMANS, B., MESSENS, K., HÖFTE, M. & HAESAERT, G., 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 445–458.
23. BAI, G.H. & PLATTNER, R. 2001. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding* 120(1): 1-6.
24. BAI, G.H., & SHANER, G. 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease* 78: 760-766.
25. BAKAN, B. 1998. Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*. Essais
26. BAKAN, B., PINSON, L., CAHAGNIER, B., MELCION, D., SÉMON, E. & RICHARD-MOLARD, D. 2001. Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives & Contaminants*, 18, 998-1003.
27. BALMAS, V., SCHERM, B., MARCELLO, A., BEYER, M., HOFFMANN, L., MIGHELI, Q. & PASQUALI, M. 2015. *Fusarium* species and chemotypes associated with *fusarium* head blight and *fusarium* root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathology*, A; article first published online: 8 JAN 2015; DOI: 10.1111/ppa.12337.
28. BALZER, A., TARDIEU, D. & BAILLY, J. D. 2004. Les trichothécènes: nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *revue Med.Vet.*, 155, 299 - 314.
29. BARREAU, C. 2013. The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 8.
30. BECHTEL, D. B., KALEIKAU, L. A., GAINES, R. L. & SEITZ, L. M. 1985. The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry*, 62, 191-197.
31. BEN AMAR, A., OUESLATI, S., GHORBEL, A. & MLIKI, A., 2012. Prediction and early detection of mycotoxigenic *Fusarium culmorum* in wheat by direct PCR-based procedure. *Food Control* 23, 506–510.
32. BENLARIBI, M. ET MONNEVEUX, P. H. 1988. Etude comparative en situation de déficit hydrique de deux variétés algériennes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) adaptées à la sécheresse. *C.R. Séances Acad.Agr. Fr.* 74(5) : 73-83.
33. BENNETT, J. W. & KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
34. BENTLEY, A.R., CROMEY, M.G., FARROKHI-NEJAD, R., LESLIE, J.F., SUMMERELL, B.A. & ETBURGESS, L.W. 2006. *Fusarium* crown and root rot pathogens associated with wheat and grasses on the South Island of New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 35: 495- 502.

35. BENYON, F.H.L., BURGESS, L.W., & SHARP, P.J. 2000. Molecular genetics investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. *Mycological Research* 104: 1164-1174.
36. BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., SCHUHMACHER, R., LEMMENS, M., ADAM, G. & KRŠKA, R. 2005. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3421-3425..
37. BETINA, V. 1989. Mycotoxins :chemical, biological, and environmental aspects. *Bioactive molecules* 9: 37 - 41.
38. BEYER, M., VERREET, J.A.& ET RAGAB, W.S.M. 2005. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *International Journal of Food Microbiology* 98: 233-240.
39. BIANCHINI, A., HORSLEY, R., JACK, M. M., KOBIELUSH, B., RYU, D., TITTELMIER, S., WILSON, W. W., ABBAS, H. K., ABEL, S., HARRISON, G., MILLER, J. D., SHIER, W. T. & WEAVER, G. 2015. DON Occurrence in Grains: A North American Perspective. *Cereal Foods World*, 60, 32-56.
40. BILY, A. C., REID, L. M., TAYLOR, J. H., JOHNSTON, D., MALOUIN, C., BURT, A. J., BAKAN, B., REGNAULTROGER, C., PAULS, K. P., ARNASON, J. T. & PHILOGENE, B. J. R. 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone : resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93, 712-719.
41. BLUHM, B. H. & FLAHERTY, J. E. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*. 65(12): 1955-1961.
42. BOTTALICO, A. 1998. *Fusarium* disease of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80, 19.
43. BOTTALICO, A. & PERRONE, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108,
44. BOUFNAR-ZAGHOANE, F.& ZAGHOANE, O.2004.La production de semences de pré-base de céréales d'hiver durant la période 1994-2003: dynamique de la gamme variétale . *Céréaliculture* 41, 5-12.ed. ITGC.
45. BOUFNAR-ZAGHOANE, F.& ZAGHOANE, O.2006. Guide des principales variétés de céréales à paille en Algérie (blé dur, blé tendre, orge et avoine).
46. BOULAL, H., ZAGHOANE, O., EI MOURID, M. & REZGHI, S. 2007. Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blé et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie).

- 47. BOUREGHDA , H., DJEGHMOUM , C. & BOUROUBI, N. 2010. Study of in vitro growth and pathogenicity of some isolates of *Fusarium* spp.: causal agent of Fusarium Head Scab and Root Rot of wheat (poster). Le proceeding du congrès MPU Rome.
48. BOUTIGNY, A. L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. thèse Université Bordeaux I.
49. BOUTIGNY, A., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2008. Natural mechanisms for plant resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *Journal of European Plant Pathology*, 121, 411-423.
50. BOUTIGNY, A.-L., ATANASOVA-PÉNICHON, V., BENET, M., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 275-286.
51. BOUTIGNY, A.L., WARD, T.J., BALLOIS, N., IANCU, G. & IOOS, R., 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 138, 133–148. Mugrabi de Kuppler, A.L., Steiner, U., Sulyok, M., Krska, R., Oerke, E.-C., 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 78–86.
52. BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
53. BOZZINI A. 1988. Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. Dans Fabiani G. et C. Lintas (éd). *Durum: Chemistry and Technology*. AACC (Minnesota), États-Unis. p. 1-16.
54. BRENNAN, J. M. & FAGAN, B. 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109(6): 577-587.
55. BROWN, D. W. & MCCORMICK, S. P. 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 32(2): 121-133.
56. BROWN, D. W. & PROCTOR, R. H. 2003. Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *J Agric Food Chem* 51(27): 7936-44
57. infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biol*, 114, 555-71.
58. BUERSTMAYR, H., BAN, T. & ANDERSON, J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128, 1-26.

59. BUNZEL, M. & J. RALPH, S. P. 2004. Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6496-6502.
60. BURGESS, L.W., SUMMERELL, B.A. & NELSON, P.E. 1991. An evaluation of several media for use in identification of some *Fusarium* species. *Australasian Plant Pathology* 20: 86- 88.
61. BURGESS, L.W., SUMMERELL, B.A., BULLOCK, S., GOTT, K. P. & BACKHOUSE, D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research, 3rd edn. Sydney, Australia, University of Sydney and Botanical Garden, pp 133.
62. BURLAKOTI, R.R., ROLANDO ESTRADA, V., RIVERA-VARAS, V., BODDEDA, A., SECOR, G.A. & ADHIKARI, T.B. 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology* 97, 835–841.
63. CARON D., DUPONT DE DINECHIN L. & MALAVERGNE D. 2006. *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs et en fonction du travail du sol. In: CR 8ème CIMA AFPP, Tours, France, pp. 293-303.
64. CARTER, J.P., REZANOOR, H.N., HOLDEN, D., DESJARDINS, A.E., PLATTNER, R.D. & NICHOLSON, P. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 573–583.
65. CHAMPEIL, A., DORE T. & FOURBET J.F. 2004 (a). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166: 1389-1415.
66. CHAMPEIL, A., DORE, T. & FOURBET, J. F. 2004 (b). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166, 1389-1415.
67. CHANDLER, E.A., SIMPSON, D.R., THOMSETT, M.A. & NICHOLSON, P. 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 355-367
68. CHRIST, D.S., MÄRLÄNDER, B., VARRELMANN, M., 2011. Characterization and mycotoxigenic potential of *Fusarium* species in freshly harvested and stored sugar beet in Europe. *Phytopathology* 101, 1330–1337.
69. CROMEY, M. G., PARKES, R. A. & FRASER, P. M. 2001. *Fusarium* levels in grain harvested from New Zealand wheat and barley crops in 2000. *New Zealand Plant Protection Volume 54, 2001. Proceedings of a conference, Quality Hotel, Palmerston North, New Zealand, 14-16 August 2001.*
70. CROMEY, M.G., SHORTER, S.C., LAUREN, D.R. & SINCLAIR, K.I. 2002. Cultivar and crop management influences on *Fusarium* head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum*

- aestivum*) in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30: 235-247.
71. DE HOOG, G.S., GUARRO, J. GENÉ, J. & FIGUERAS, M.J. 2000. Atlas of clinical fungi, Centraal bureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands. pp 1126.
 72. DESJARDINS, A. E. 2006. *Fusarium mycotoxines chemistry, genetics, and biology*, St. Paul, Minesota U.S.A.
 73. DESJARDINS A.E. & HOHN T.M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 147-152.
 74. DESJARDINS, A. E., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1993. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species - Chemistry, Genetics, and Significance. *Microbiological Reviews*, 57, 595-604.
 75. DESJARDINS, A.E., BUSMAN, M., MANANDHAR, G., JAROSZ, A.M., MANANDHAR, H.K., PROCTOR, R.H., 2008. *Gibberella* Ear Rot of maize (*Zea mays*) in Nepal: distribution of the mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol in naturally and experimentally infected maize. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5428–5436.
 76. DESJARDINS A.E., PROCTOR R.H., BAI G., MCCORMICK S.P., SHANER G., BUECHLEY G. & HOHN T.M. 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 775-781.
 77. D'MELLO, JPF, PLACINTA, CM & MACDONALD, AMC 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80: 183-205.
 78. DONMEZ, E., R.G. SEARS, J.P. SHROYER ET G.M. PAULSEN. 2000. Evaluation of Winter Durum Wheat for Kansas. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. Publication No 00-172-S.
 79. DOOHAN F. M., BRENNAN J. ET COOKE B. M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 755-768.
 80. DOOHAN, F.M., PARRY, D.W., JENKINSON, P. & NICHOLSON, P. 1998. The use of species specific PCR based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology* 47: 197-205.
 81. DOOHAN F.M., WESTON G., REZANOOR H.N., PARRY D.W. & NICHOLSON P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and *in planta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3850-3854.
 82. DYER, R. B., PLATTNER, R. D., KENDRA, D. F. & BROWN, D. W. 2005. *Fusarium graminearum* TRI14 Is Required for High Virulence and DON Production on Wheat but Not for DON Synthesis in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9281-9287.

83. EDEL, V., STEINBERG, C., GAUTHERON, N. & ALABOUVETTE, C. 2000. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research* 104: 518-526.
84. EDWARDS, S. G. 2004. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters* 153(1): 29-35.
85. EDWARDS, S., O'CALLAGHAN, J. & DOBSON, A.D.W. 2002. PCR based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106: 1005-1025.
86. ERIKSEN G.S. 2003. Metabolism and toxicity of trichothecenes. In: *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Sweden*, 38 p
87. EUDES F., COMEAU A., RIOUX S. & COLLIN J. 2000. Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with the fusariosis of wheat spikelets. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 286-292.
88. EUDES, F., COMEAU, A., RIOUX, S. & COLLIN, J. 2001. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 318-322.
89. FAO 2016. Production de blé en Algérie. <https://fr.actualitix.com/pays/dza/algerie-ble-production.php.A>.
90. FAVRE L., VERDAL-BONNIN M.N., PINSON-GADAIS L., ROUMET P., BARREAU C. & RICHARD-FORGET F. 2004. Does biochemical composition of durum wheat kernels influence the trichothecenes B (TCT B) contamination levels. In: 2nd International Symposium on *Fusarium* Head Blight., Orlando, Florida, USA.
91. FEILLET, P. 1977. Le grain de blé Composition et utilisation . INRA. Paris. Page (1, 5,6) / 281 pages.
92. FEILLET, P. 2000. Le grain de blé composition et utilisation. In: INRA EDITIONS, Paris, France, p. 308.
93. FELDMAN M., 2001. Origine of cultivate wheat .Dans Bonjean A.P et W.J.Angus Ed The world wheat book :a history of wheat breeding .Intercept Limited , Andover , Angleterre .,p:3-58.
94. FELIACHI, K., AMROUN, R. & KHALDOUN, A.2001. Impact de la sécheresse sur la production des céréales cultivées dans le Nord de l'Algérie. *Céréaliculture*, 35, 28-37.
95. FOROUD, N. A. & EUDES, F. 2009. Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10,147-173.
96. FRANCIS, R.G. & BURGESS, L.W. 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'graminearum' in eastern Australia, *Transactions of the British Mycological Society* 68: 421-427.

97. GANG, G., MIEDANER, T., SCHUHMACHER, U., SCHOLLENBERGER, M. & GEIGER, H.H. 1998. Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology* 88, 879–884.
98. GILBERT, J., ABRAMSON, D., MCCALLUM, B. & CLEAR, R. 2001. Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia* 153, 209–215.
99. GILBERT, J., CLEAR, R.M., PATRICK, S., SLUSARENKO, K., WOLFE, C. 2011. Ratio of 3-ADON and 15-ADON isolates of *Fusarium graminearum* recovered from wheat plants inoculated and incubated at various temperatures. Proceedings of the Plant Canada Meeting Halifax, Nova Scotia, July 17–21, 2011. Saint Mary's University, Halifax, Nova Scotia, p. 172.
100. GLYNN, N. C., HARE, M. C., PARRY, D. W., & EDWARDS, S. G. 2005. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status. *Mycological Research*, 109, 872–880.
101. GOSMAN, N., SRINIVASACHARY, STEED, A., CHANDLER, E., THOMSETT, M. & NICHOLSON, P. 2010. Evaluation of type I *Fusarium* head blight resistance of wheat using nondeoxynivalenol- producing fungi. *Plant Pathol.* 59, 147–157.
102. GOSWAMI R.S. & KISTLER H.C. 2004 Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
103. GREENHALGH, R., NEISH, G.A. & MILLER, J.D. 1983. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 625-629.
104. HAMADACHE, A. 2013. Elément de phytotechnie générale-Grandes cultures- Principaux itinéraires techniques des principales espèces de grandes cultures pluviales cultivées en Algérie et en Afrique du Nord (agriculture conventionnelle) Tome I: Le blé, p.230.
105. HARLAN, JR. 1975. Crops and man. *ASA and CSSA, Eds. Madison, Wisconsin*, 325 pages.
106. HARRIS, P. J. & R. D. HARTLEY 1980. Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology* 8(2): 153-160.
107. HARRIS L.J., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D., NICHOLSON P., BUTLER G., YOUNG J.C., WESTON G., PROCTOR R.H. & HOHN T.M. 1999 Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease*, 83, 954-960.
108. HAZEL, C. M. & PATEL, S. 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol Lett*, 153, 51-9.
109. HAZMOUNE, T. 2000. Erosion des variétés de blé dur cultivées en Algérie : perspectives. *Ciheam*, 2000. p. 291 -294.

110. HENRY, Y. J. BUYSER. 2000. L'origine du blé. Pour la Science 26 :60-62.
111. HESTBJERG, H., FELDING, G. & ELMHOLT, S. 2002. *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *J. Phytopathology*, 150, 308-312.
112. HOCKING A. & ANDREWS S. 1987. Dichloran chloramphenicol peptone agar as an identification medium for *Fusarium* species and some dematiaceous hyphomycètes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89 (2). 239-244.
113. HOGG, A.C., JOHNSTON, R.H., STON, J.A., KLOUSER, L., KEPHART, K.D. & DYER, A.T. 2010. Monitoring *Fusarium* Crown Rot populations in spring wheat residues using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 100, 49-57.
114. HOHN, T.M. & BEREMAND, P.D. 1989. Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpen cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79: 131-138.
115. HOHN, T. & DESJARDINS, A.E. 1992. Isolation and gene disruption of the tox5 gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*, *Molec. Plant-Microbe Interactions* 5:249-256.
116. HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1993. Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics* 24(4): 291-295.
117. HOLLAWAY, G. J., EVANS, M. L., WALLWORK, H., DYSON, C. B. & MCKAY, A. C. 2013. Yield Loss in Cereals, Caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, Is Related to Fungal DNA in Soil Prior to Planting, Rainfall, and Cereal Type. *Plant Disease*, 97, 977-982.
118. HSU, M.C., CHEN, K.W., LO, H.J., CHEN, Y.C., LIAO, M.H., LIN, Y.H., ET LI, S.Y. 2003. Species identification of medically important fungi by use of real-time Light Cycler PCR. *Journal of Medical Microbiololgy* 52: 1071-1076.
119. ILGEN, P., HADELER, B., MAIER, F. J. & SCHÄFER, W. 2009. Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 899-908.
120. IOOS R., 2001. Les *Fusarium* et *Microdochium* sur grains de céréales en France. *Phytoma* 539: 52-55.
- 121 IOOS, R., BELHADJ, A. & MENEZ, M. 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia*, 158, 351-362.
122. IORDANOV, M. S. & PRIBNOW, D. 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by

sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Molecular and Cellular Biology* 17(6): 3373.

123. JANSEN C., VON WETTSTEIN D., SCHAFFER W., KOGEL K.H., FELK A. & MAIER F.J. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16892-16897.
124. JEAN-PAULE CHAVRET, 1977. Le blé dans le monde. Évolution récente de la consommation, de la commercialisation et de la production. *Annales de géographie*, 86 N. 478 pp. 686-723
125. JESTOI, M.N., PAAVANEN-HUHTALA, S., PARIKKA, P., YLI-MATTILA, T. 2008. In vitro and in vivo mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 41, 545–558.
126. JOFFE A.Z. 1983. Environmental conditions conducive to *Fusarium* toxin formation causing serious outbreaks in animals and man. *Veterinary Research Communications*, 7, 187-193.
127. KAMMOUN, L. G., GARGOURI, S., HAJLAOUI, M. R. & MARRAKCHI, M. 2009. Occurrence and Distribution of *Microdochium* and *Fusarium* Species Isolated from Durum Wheat in Northern Tunisia and Detection of Mycotoxins in Naturally Infested Grain. *Journal of Phytopathology*, 157, 546-551.
128. KAMMOUN, L. G., GARGOURI, S., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & HAJLAOUI, M. R. 2010. Trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* infecting wheat in Tunisia. *Int J Food Microbiol*, 140, 84-9.
129. KAWAKAMI, A., NAKAJIMA, T., HIRAYAE, K. 2014. Effects of carbon sources and amines on induction of trichothecene production by *Fusarium asiaticum* in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 204–212.
130. KIM K.-H., TSAO R., YANG R. & CUI S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95, 466-473..
131. KIM, S.K., PARK, P.J., BYUN, H.G., JE, J.Y., MOON, S.H., ET KIM, S.H. 2003. Recovery of fish bone from hoki (*Johnius belengeri*) frame using a proteolytic enzyme isolated from mackerel intestine. *Journal of Food Biochemistry* 27: 255-266.
132. KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. & FUJIMURA, M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 2105-23.
133. KIMURA, M., TOKAI, T., O'DONNELL, K., WARD, T.J., FUJIMURA, M., HAMAMOTO, H., SHIBATA, T., ET YAMAGUCHI, I. 2003. The trichothecene biosynthesis cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters* 539, 105-110.

134. KLEIJER G., MICHEL V., 2001. Observations sur la résistance du triticale et du blé à la fusariose sur épi. *Revue suisse d'Agriculture* 33: 271-274..
135. KOCH, H.J. CHRISTODULOS, P., ET MAERLAENDER, B. 2006. Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *European Journal of Agronomy* 24: 357- 366.
136. KORN, U., MÜLLER, T., ULRICH, A., MÜLLER, M.E.H., 2011. Impact of aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F.culmorum* isolates on yield parameters and mycotoxin production in wheat. *Mycotoxin Res.* 27, 195–206.
137. KULIK, T., 2011. Development of Taq Man assays for 3ADON, 15-ADON and NIV *Fusarium* genotypes based on Tri12 gene. *Cereal Res. Commun.* 39, 200–214.
138. LADAY, M., BAGI, F., MESTERHAZY, A. ET SZECSEI, A. 2000. Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*. *Mycological Research* 104: 788-793.
139. LAMPRECHT, S. C., MARASAS, W. F. O., HARDY, M. B. & CALITZ F. J. 2006 Effect of crop rotation on crown rot and the incidence of *Fusarium pseudograminearum* in wheat in the Western Cape, South Africa. *Australasian Plant Pathology*,35:419-426.
140. LARABA I, BOUREGHDA H, ABDALLAH N, BOUAICHA O, OBANOR F, MORETTI A, GEISER DM, KIM HS, MCCORMICK SP, PROCTOR RH, KELLY AC, WARD TJ, O'DONNELL K. 2017. Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol* 103:34-41.
141. LASKIN, J. D. & HECK, D. E . 2002. The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAP kinase activation in xenobiotic toxicity. *Toxicological Sciences* 69(2): 289.
142. LAUMONT, P. & ERROUX, J. 1961. Inventaires des blés durs rencontrés et cultivés en Algérie. *Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, 5 : 96.
143. LEBART L., MORINEAU A. & PIRON. 1995. *M. Statistique Exploratoire Multidimensionnelle*. Dunod, Paris, 1995 (1ère édition) , 2006 (4^{ème} édition), 434p.
144. LEES, A. 1995. Diagnosis and Control of Foot Rot Pathogens of Wheat. Buckinghamshire, UK: Open University, PhD thesis, 353p.
145. LEE, T., HAN, Y., KIM, K., YUN, S. & LEE, Y. 2002. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2148-2154.
146. LEMPEREUR I, ROUAU X. & ABECASSIS J. 1997. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25, 103-110.

147. LEMPEREUR I., SURGET A. & ROUAU X. 1998. Variability in dehydrodiferulic acid composition of durum wheat (*Triticum durum* desf.) and distribution in milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 28, 251-258.
148. LEONARD, K. J. & BUSHNELL, W. R. 2003. *Fusarium head blight of wheat and barley*, St. Paul, Minn., APS Press, pp 120-143.
149. LESLIE J.F. & SUMMERELL B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. In: Blackwell publishing, 388p
150. LIONETTI, V., GIANCASPRO, A., FABRI, E., GIOVE, S. L., REEM, N., ZABOTINA, O. A., BLANCO, A., GADALETA, A. & BELLINCAMPI, D. 2015. Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biol*, 15, 6.
151. LIU, W. & ELEN O. N.. 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 103(7): 589-595.
152. LLORENS, A., HINOJO, M.J., MATEO, R., GONZALEZ-JAEN, M.T., VALLE-ALGARRA, F.M., LOGRIECO, A., JIMENEZ, M., 2006. Characterization of *Fusarium spp.* isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int. J. Food Microbiol.* 106, 297–306.
153. LNPV, 2002. Détection et identification des espèces de *Fusarium spp.* et *Microdochium nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi sélectif et étude microbiologique ». LNPV. Malzeville. *MH/03/16 version a.* 26p.
154. LOGRIECO 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597-609.
155. LOGRIECO, A. & VISCONTI, A. 2004. An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe, *Kluwer Academic Publ.* 247p.
156. LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., MULÉ, G., MORETTI, A. & PERRONE, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109: 645–667.
157. LORI G.A., HENNING C.P., VIOLANTE A., ALIPPI H.E. & VARSAVSKY E. 1990. Relation between the production of deoxynivalenol and zearalenone and the mycelium growth of *Fusarium graminearum* on natural solid substrates. *Microbiologia*, 6, 76-82.
158. LORI, G. A., SISTERNA, M. N., SARANDON, S. J., RIZZO, I. & CHIDICHIMO, H. 2009. *Fusarium* Head Blight in wheat : impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection* 28: 495-502.
159. MACKINTOSH, C.A., LEWIS, J., RADMER, L.E. SHIN, S., HEINEN, S.J., SMITH, L.A., WYCKOFF, M.N., DILL-MACKY, R., EVANS, C.K., KRAVCHENKO, S., BALDRIDGE,

- G.D., ZEYEN R.J., ET MUEHLBAUER, G.J. 2007. Overexpression of defense response genes enhances the resistance of wheat to *Fusarium* Head Blight. *Plant Cell Reports* 26: 479-488.
160. MAIER, F. J., MIEDANER, T., HADELER, B., FELK, A., SALOMON, S., LEMMENS, M., KASSNER, H. & SCHAFER, W. 2006. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7, 449-461.
161. MALBRÁN, I., MOURELOS, C.A., GIROTTI, J.R., BALATTI, P.A. & LORI, G.A., 2014. Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology* 104, 357-364.
162. MARIN S., RAMOS A.J. & SANCHIS V. 2005. Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329-341.
163. MASCHER F., MICHEL V. & BROWNE R. A, 2005. Sélection de variétés de blé et de triticale résistantes à la fusariose sur épi . *Agroscope*. 375: 189-194 p
164. MASUDA D., ISHIDA M., YAMAGUCHI K., YAMAGUCHI I., KIMURA M. & NISHIUCHI T. 2007. Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1617-1626.
165. MATIAS PASQUALI & QUIRICO MIGHELI, 2014. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. *International Journal of Food Microbiology* 189 (2014) 164-182.
166. MC CALLUM J.A. & WALKER J.R.L. 1991. Phenolic biosynthesis during grain development in wheat (*Triticum aestivum* L.) III. Changes in hydroxycinnamic acids during grain development. *Journal of Cereal Science*, 13, 161-172.
167. MC CORMICK, S. P., ALEXANDER N.J., TRAPP S.E. & HOHN T.M. 1999. Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5252-5256.
168. MC CORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
169. MC CORMICK, S.P., HARRIS, L.J., ALEXANDER, N.J., OUELLET, T., SAPARNO, A., ALLARD, S. ET DESJARDINS, A.E. 2004. Tri1 in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2044-2051.
170. MC KEEHEN J.D., BUSH R.H. & FULCHER R.G. 1999. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1476-1482.

171. MC MULLEN, M., JONES, R. & GALLENBERG, D. 1997. Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.
172. MEEK, I. B., A. PELOW, A.W., AKE JR, C., PHILLIPS, T.D., ET BEREMAND, M.N. 2003. Tri1 encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new Tri gene. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3):1607-1613.
173. MESTERHAZY, A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* Head Blight of wheat. *Plant Breeding*, 114(5): 377-386.
174. MESTERHÁZY, Á. 1983. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*. *Z. Pflanzzüchtg*, 91: 285-311.
175. MESTERHÁZY, Á. 1984. A laboratory method to predict pathogenicity of *Fusarium graminearum* in field and resistance of wheat to scab. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 19: 205-218.
176. MESTERHÁZY, Á. 1997. Methodology of resistance testing and breeding against *Fusarium* head blight in wheat and results of selection. *Cereal Research Communication*. 25:631-637.
177. MESTERHÁZY, A., 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* Head Blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 675–684.
178. MESTERHAZY, A., BARTOK, T., MIROCHA, C.G., ET KOMOROCZY, R. 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118: 97-110.
179. MICHEL, V 2001. La sélection de variétés de blé et de triticale résistantes aux maladies. *Revue suisse Agric.* 33 (4): 133-140, 2001
180. MIEDANER, T., CAIXETA, F., TALAS, F., 2013. Head-blighting populations of *Fusarium culmorum* from Germany, Russia, and Syria analyzed by microsatellite markers show a recombining structure. *Eur. J. Plant Pathol.* 137, 743–752.
181. MIEDANER, T., REINBRECHT, C. & SCHILLING, A. 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107, 124-134.
182. MIEDANER, T., REINBRECHT, C., LAUBER, U., SCHOLLENBERGER, M. & GEIGER, H. H. 2001. Effects of genotype and genotype environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding*, 120, 97-105.
183. MILLER, J. D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants* 25(2): 219-230.

184. MILLER, J. D. & ARNISON, P. G. 1986. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8, 147-150.
185. MILLER, J. D. & M. A. EWEN 1997. Toxic effects of deoxynivalenol on ribosomes and tissues of the spring wheat cultivars Frontana and Casavant. *Nat Toxins* 5(6): 234-7.
186. MILLER, J. & GREENHALGH, R. 1985. Nutrient effects on the biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 77(1): 130 - 136.
187. MILLER J.D. & YOUNG J.C. 1985 Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7, 132-134.
188. MILLER, J.D. YOUNG, J.C. & TRENHOLM, H.L. 1983. *Fusarium* toxins in field corn: Parameters associated with fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany*, 61: 3080-3087.
189. MILLER, J. D., YOUNG, J. C. & SAMPSON, D. R. 1985. Deoxynivalenol and *Fusarium* Head Blight Resistance in Spring Cereals. *Journal of Phytopathology*, 113, 359-367.
190. MILLER, J.D., GREENHALGH, R., WANG, Y.Z. & LU, M., 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia* 83, 121–130.
191. MIROCHA, C.J., ABBAS, H.K., WINDELS, C.E. & XIE, W., 1989. Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1315–1316.
192. MIROCHA, C. J., XIE, W., XU, Y., WILCOXSON, R. D., WOODWARD, R. P., ETEBARIAN, R. H. & BEHELE, G. 1994. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* on barley and wheat. *Mycopathologia* 128(1): 19-23.
193. MISHRA, P.K., FOX, R.T.V., ET CULHAM, A. 2003. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* 143: 291-301
194. MÖLLER, E.M., BAHNWEG, G., SANDERMANN, H., GEIGER, H.H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit body and infected plant tissue. *Nucleic Acids Research*, 20, 6115-6116.
195. MONTIBUS, M., PONTS, N., ZEHRAOUI, E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Fgap1-mediated response to oxidative stress in trichothecene-producing *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Reports*, 60, 410
196. MOORE, J., LIU, J. G., ZHOU, K. Q. & YU, L. L. 2006. Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5313-5322.

197. MPOFU A., SAPIRSTEIN H.D. & BETA T. 2006. Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1265-1270.
198. MUGRABI DE KUPPLER, A.L., STEINER, U., SULYOK, M., KRŠKA, R., OERKE, E.-C., 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 78–86.
199. MÜLLER, H.-M., SCHWADORF, K., 1993. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. *Mycopathologia* 121, 115–121.
200. MURRAY, G.M. & BRENNAN, P. 2009. Estimating disease losses to the Australian wheat industry. *Australasian plantpathology*, 38, 558-70.
201. NDOYE, M., ZHANG, J.B., WANG, J.H., GONG, A.D., LI, H.P., QU, B., LI, S.J., LIAO, Y.C., 2012. Nivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* clade species are prevalent on maize throughout China. *J. Phytopathol.* 160, 519–524.
202. NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., ET MARASAS, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Penn sylvania University Press, London.
203. NGUYEN, L. N., BORMANN, J., LE, G. T. T., STÄRKEL, C., OLSSON, S., NOSANCHUK, J. D., GIESE, H. & SCHÄFER, W. 2011. Autophagy-related lipase FgATG15 of *Fusarium graminearum* is important for lipid turnover and plant infection. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 217-224.
204. NICHOLSON, P. & PARRY, D.W. 1996. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis* the cause of sharp eyespot in wheat. *Plant Pathology* 45:872-883.
205. NICHOLSON, P., SIMPSON, D.R., WILSON, A.H., CHANDLER, E., THOMSETT, M., 2004. Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 503–514.
206. NICHOLSON, P., SIMPSON, D.R., WESTON, G., REZANOOR, H.N., LEES, A.K., PARRY, D.W., ET JOYCE, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereal using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53:17-38.
207. NICOLAISEN, M., S. SUPRONIENE, & AL. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76(3): 234-240.
208. NIESSEN, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 119: 38 - 46.
209. NIESSEN, M. L. & VOGEL, R. F. 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-Species in pure cultures and cereal samples. *Syst Appl Microbiol*, 21, 618 - 631.

210. NIELSEN, L.K., JENSEN, J.D., RODRÍGUEZ, A., JØRGENSEN, L.N., JUSTESEN, A.F., 2012. TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 384–392.
211. OBANOR, F. & CHAKRABORTY, S. 2014. Aetiology and toxigenicity of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* causing crown rot and head blight in Australia under natural and artificial infection. *Plant Pathology*, 63, 1218-1229.
212. O'DONNELL, K., WARD, T.J., ABERRA, D., KISTLER, H.C., AOKI, T., ORWIG, N., KIMURA, M., BJØRNSTAD, S., KLEMSDAL, S.S., 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1514–1522.
213. OK, H.E., KIM, D.M., KIM, D., CHUNG, S.H., CHUNG, M.S., PARK, K.H., CHUN, H.S., 2014. Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control* 37, 284–291.
214. ONYENEHO, S. N. & HETTIARACHCHY, N. S. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1496-1500.
215. OSBORNE, L.E., ET STEIN, J.M. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119: 103-108.
216. PARRY, D. W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. 1995. *Fusarium* Ear Blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant pathology*, 44, 207-238.
217. PARRY, D.W., ET NICHOLSON, P. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45: 383-391.
218. PARRY, D.W., PETTIT, T.R., JENKINSON, P. & LEES, A.K. 1994. The cereal *Fusarium* complex. In *Ecology of plant pathogens* . (Eds JP Blakeman, B Williamson) (CAB International: Wallingford, UK) pp. 301-320.
219. PASQUALI, M. & MIGHELI, Q. 2014. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 164-182.
220. PASQUALI, M., GIRAUD, F., BROCHOT, C., COCCO, E., HOFFMANN, L., BOHN, T., 2010. Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 246–253.
221. PEREYRA, S.A., DILL-MACKY, R., ET SIMS, A.L. 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease* 88: 724-730.
222. PERKOWSKI, J., KIECANA, I., SCHUMACHER, U., MÜLLER, H.-M., CHEŁKOWSKI, J. & GOLINSKI, P. 1996. Head blight and biosynthesis of *Fusarium* toxins in barley kernels field inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 491-496.

223. PESTKA, J. J. 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 84, 663-79.
224. PEYRON S., SURGET A., MABILLE F., AUTRAN J.C., ROUAU X. & ABECASSIS J. 2002. Evaluation of tissue dissociation of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) generated by the milling process. *Journal of Cereal Science*, 36, 199-208.
225. PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in *real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res.* 29:2002-2007.
226. PFAFFL, M. W., G. W. HORGAN, AND L. DEMPFFLE. 2002. Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in *real-time PCR*. *Nucleic Acids Res.* 30:1-1
227. PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., CHAURAND, M., GREGOIRE, S., MONMARSON, M. & RICHARD-FORGET, F. 2007. Distribution of toxigenic *Fusarium spp.* and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. *Food Addit Contam*, 24, 53-62.
228. PIRGOZLIEV S.R., EDWARDS S.G., HARE M.C. & JENKINSON P. (2003) Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731-742.
229. PLACINTA, C. M., J. P. F. D'MELLO, ET AL. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78(1/2): 21-37.
230. PONTS, N. 2005. Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines de *Fusarium spp.* contaminantes de l'épi de Maïs. Bordeaux, Université Bordeaux 1: 415.
231. PONS, S. 2010. Importance du choix variétal dans la maîtrise des niveaux de contamination en trichothécènes B des récoltes de maïs. Bordeaux, Université Bordeaux 1: 274.
232. PONTS N., PINSON-GADAIS L., BARREAU C., RICHARD-FORGET F. & OUELLET T. 2007 Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, 581, 443-447.
233. PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2011. Cinnamic derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology*, 101, 929-34.
234. PONTS, N., L. PINSON-GADAIS, VERDAL-BONNIN M.N., BARREAU C. & RICHARD-FORGET F. 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15- acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters* 258(1): 102-107.
235. POPPENBERGER, B., BERTHILLER, F., LUCYSHYN, D., SIEBERER, T., SCHUHMACHER, R., KRŠKA, R., KUČHLER, K., GLOSSL, J., LUSCHNIG, C. &

- ADAM, G. 2003. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyl transferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 278, 47905-14.
236. PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 593-601.
237. PROCTOR R.H., DESJARDINS A.E., MCCORMICK S.P., PLATTNER R.D., ALEXANDER N.J. & BROWN D.W. 2002. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 691-698.
238. QUARTA, A., MITA, G., HAIDUKOWSKI, M., SANTINO, A., MULÈ, G., ET VISCONTI, A. 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Additives and Contaminants* 22: 309-315.
239. RAMIREZ, M.L., REYNOSO, M.M., FARNOCHI, M.C., CHULZE, S., 2006. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 115, 139–148.
240. RASTOIN, J.L & BENABDERRAZIK, E. 2014. Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb Pour un co-développement de filières territorialisées. IPEMED. p32.
241. REBIB, H., BOURAOU, H., ROUAISSI, M., BRYGOO, Y., BOUDABBOUS, A., HAJLAOUI, M.R., SADFI-ZOUAOU, N., 2014. Genetic diversity assessed by SSR markers and chemotyping of *Fusarium culmorum* causal agent of foot and root rot of wheat collected from two different fields in Tunisia. *Eur. J. Plant Pathol.* 139, 481–493.
242. REGNIER T. & MACHEIX J.J. 1996. Changes in wall-bound phenolic acids, phenylalanine and tyrosine ammonia-lyases, and peroxidases in developing durum wheat grains (*Triticum turgidum* L var Durum). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1727-1730.
243. REGULATION EC N°1881/2006 setting maximum level for some contaminants in foodstuff. Journal officiel de l'Union Européenne L 365/5 20/12/2006
244. REID, L. M. & MATHER. D. E. 1996. Distribution of deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*-infected maize ears. *Phytopathology* 86(1): 110-114.
245. REID, L. M., MATHER, D. E., ARNASON, J. T., HAMILTON, R. I. & BOLTON, A. T. 1992. Changes in Phenolic Constituents of Maize Silk Infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 70, 1697-1702.
246. RIOS, G., & PINSON-GADAIS, L. 2009. Assessment of dehulling efficiency to reduce deoxynivalenol and *Fusarium* level in durum wheat grains. *Journal of Cereal Science* 49(3): 387-392.
247. ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food additives and contaminants*, 22, 369-378.

248. ROHACIK T. & HUDEC K. 2005. Influence of agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 39-45.
249. ROSSI, V., CERVI, C., CHIUSA, G. & LANGUASCO, L. 1995. Fungi Associated with Foot Rots on Winter Wheat in Northwest Italy. *Journal of Phytopathology*, 143, 115-119.
250. RUTH, V.D.H., WAALWIJK, C & VRIES., I.D. 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using Taq Man. *European Journal of Plant Pathology* 110, 481 - 494.
251. SANTIAGO, R., REID L.M., ARNASON J.T., ZHU X.Y., MARTINEZ N. & MALVAR R.A. 2007. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to *Gibberella* stalk rot (*Fusarium graminearum* schwabe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5186-5193.
252. SARAF A., LARSSON L., BURGE H. & MILTON D. 1997. Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2554-2559.
253. SAREMI, H., AMMARELLOU, A. & JAFARY, H., 2007. Incidence of crown rot disease of wheat caused by *Fusarium pseudograminearum* as a new soil born fungal species in North West Iran.. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10: 3606-3612.
254. SCHAAFSMA, A. W & HOOKER D. C. 2007. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize." *International Journal of Food Microbiology* 119 (1-2): 116-125.
255. SCHAAFSMA, AW, TAMBURIC-ILINIC, L, MILLER, JD & HOOKER, DC 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 279-285.
256. SCHERM, B., BALMAS, V., SPANU, F., PANI, G., DELOGU, G., PASQUALI, M. & MIGHELI, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: Causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14, 323-341.
257. SCHILLING, A.G., MÜLLER, E.M., ET GEIGER, H.H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology*, 86, 515-522.
258. SCHNERR, H., L. NIESSEN, & AL. 2001. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler(TM)-PCR using SYBR®Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology* 71(1): 53-61.

259. SCHNERR, H., R. F. VOGEL, & AL. 2002. Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in applied microbiology* 35(2): 121-125.
260. SCHOLLENBERGER M., MULLER H.M., RUFLE M., TERRY-JARA H., SUCHY S., PLANK S. & DROCHNER W. 2007. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 142-146.
261. SCHROEDER, H. W. & CHRISTENSEN, J. J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53, 831-838.
262. SCHWADORF, K. & MULLER, H. 1989. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*, 72, 457-62.
263. SEITZ L.M., MOHR H.E., BURROUGHS R. & SAUER D.B. 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, 54, 1207-1217.
264. SHEN, C.-M., HU, Y.-C., SUN, H.-Y., LI, W., GUO, J.-H. & CHEN, H.-G. 2012. Geographic Distribution of Trichothecene Chemotypes of the *Fusarium graminearum* Species Complex in Major Winter Wheat Production Areas of China. *Plant Disease*, 96, 1172-1178.
265. SIMPSON, D.R., THOMSETT, M.A., ET NICHOLSON, P. 2004. Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and *in vitro*. *Environmental Microbiology* 6: 79-87.
266. SIRANIDOU, E., KANG, Z. & BUCHENAUER, H. 2002. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology*, 150, 200-208.
267. SMILEY, R.W. 2002. Soilborne crop pathogens under direct seeding: *Fusarium*. *Northwest direct seed conference proceedings*, p 70-88.
268. SMILEY, R.W. & PATTERSON, L.M. 1996. Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Dis.*, 80: 944-949.
269. SNIJDERS C.H.A. & PERKOWSKI J. 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology*, 80, 566-570.
270. SPOLTI, P., DEL PONTE, E., DONG, Y., CUMMINGS, J.A., BERGSTROM, G.C., 2014. Assessment of triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis.* 98, 607-613.
271. SUGIURA Y., WATANABE Y., TANAKA T., YAMAMOTO S. & UENO Y. 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3047-3051.
272. SUTTON, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.

273. SWEENEY, M. J. & DOBSON, A. D. W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 149-163.
274. SZÉCSI, Á., BARTÓK, T., VARGA, M., MAGYAR, D., MESTERHÁZY, Á., 2005. Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *J. Phytopathol.* 153, 445-448.
275. TAG, A. G., GARIFULLINA, G. F., PELOW, A. W., AKE, C., PHILLIPS, T. D., HOHN, T. M. & BEREMAND, M. N. 2001. A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5294-5302.
276. TALAS, F., WÜRSCHUM, T., REIF, J.C., PARZIES, H.K., MIEDANER, T., 2012. Association of single nucleotide polymorphic sites in candidate genes with aggressiveness and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum* causing wheat head blight. *BMC Genet.* 13, 14.
277. TAN, D.C., FLEMATTI, G.R., GHISALBERTI, E.L., SIVASITHAMPARAM, K., CHAKRABORTY, S., OBANOR, F., JAYASENA, K., BARBETTI, M.J., 2012. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. Associated with *Fusarium* head blight of wheat in Western Australia. *Mycotoxin Res.* 28, 89–96.
278. TEICH A.H. & NELSON K. 1984. Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. *Canadian Plant Disease Survey*, 64, 11-13.
279. TÓTH, B., MESTERHÁZY, Á., NICHOLSON, P., TÉREN, J., VARGA, J., 2004. Mycotoxin production and molecular variability of european and american isolates of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 587–599.
280. TUNALI, B., NICOL, J., YELDA EROL, F., ET ALTIPARMAK, G. 2006. Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions. *Journal of Plant Pathology* 5: 143-149.
281. TURNER, A.S., LEES, A.K., REZANOOR, H.N., ET NICHOLSON, P. 1998. Refinement of PCR detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phylogenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology* 47: 278-288.
282. UENO Y. 1985. The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology*, 14, 99-132.
283. VAN LEUR, J.A.G, ET BAILEY, K.L. 2000. The occurrence of barley root diseases in different agri-ecological zones of Syria. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 61-68.
284. VENKATARAMANA, M., SHILPA, P., BALAKRISHNA, K., MURALI, H.S., BATRA, H.V., 2013. Incidence and multiplex PCR based detection of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates collected from freshly harvested maize kernels in Southern India. *Braz. J. Microbiol.* 44, 401–406.

285. WAALWIJK C., KASTELEIN P., VRIES I.D., KERENYI Z., LEE T.V.D., HESSELINK T., KOHL J. & KEMA G. 2003. Major changes in *Fusarium spp.* in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 743-754.
286. WAGACHA, J.M., ET MUTHOMI, J.W. 2007. *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26: 877-885.
287. WALTER, S., NICHOLSON, P. & DOOHAN, F. M. 2009. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytol*, 185, 54-66.
288. WANG, Y.Z. ET MILLER, J.D. 1988. Effects of metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Phytopathology* 122: 118-125.
289. WARD, T.J., BIELAWSKI, J.P., KISTLER, H.C., SULLIVAN, E., O'DONNELL, K., 2002. Ancestral polymorphism polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc.Natl.Acad. Sci* 99(14): 9278-9283
290. WARD, T.J., CLEAR, R.M., ROONEY, A.P., O'DONNELL, K., GABA, D., PATRICK, S., STARKEY, D.E., GILBERT, J., GEISER, D.M., NOWICKI, T.W., 2008. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genet. Biol.* 45, 473-484.
291. WEGULO, S. N. 2012. Factors Influencing Deoxynivalenol Accumulation in Small Grain Cereals. *Toxins*, 4, 1157-1180.
292. WILLIAMS, K.J. DENNIS, J.J. SMYL, C., ET WALLWORK, H. 2002. The application of species specific assays based on the polymerase chain reaction to analyse *Fusarium* crown rot of durum wheat, *Australasian Plant Pathology* 31: 119-127.
293. WILCOXON, R. D., KOMMEDAHL, T., OZMON, E. A. & WINDELS, C. 1988. Occurrence of *Fusarium* species in scabby wheat from Minnesota and their pathogenicity to wheat. *Phytopathology*, 78, 586-589.
294. WINDELS, C.E. 1991 (a). Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology* 81:1048-1051.
295. WINDELS, C.E. 2000 (b). Economic and social impact of *Fusarium* head blight. Changing farms and rural communities in the northern Great Plains *Phytopathology* 90: 17-21.
296. WUCHIYAMA J., KIMURA M. & YAMAGUCHI I. 2000. A trichothecene efflux pump encoded by *Tri102* in the biosynthetic gene cluster of *Fusarium graminearum*. *Journal of Antibiotics*, 53, 196-200.
297. WU, TG, V.V., KEASLER, MITCHELL, B.M., ET WILHELMUS, K.R. 2004. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis. *The Journal of Infectious Diseases* 190: 192-198

298. XU, X.M. 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 109: 683-689.
299. XU, X. M. & BERRIE, A. M. 2005. Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: a review. *Food Addit Contam*, 22, 290-301.
300. XU, X. & NICHOLSON, P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 83-103.
301. XUE, A.G., ARMSTRONG, K.C., VOLDENG, H.D., FEDAK, G., ET BABCOCK, C. 2004. Comparative aggressiveness of isolates of *Fusarium* spp. causing head blight on wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 81-88.
302. YAO H., CHEN L., SUN F., CHEN G. & YU G. 2005. Significant reduction in pathogenicity in *Fusarium graminearum* caused by knock-out of *Tri12*, a trichothecene efflux pump gene. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28, 32-36.
303. YEKKOUR, A., TOUMATIA, O., MEKLAT, A., VERHEECKE, C., SABAOU, N., ZITOUNI, A., MATH, A. 2015 Deoxynivalenol-producing ability of *Fusarium culmorum* strains and their impact on infecting barley in Algeria. *World J Microbiol Biotechnol*, 31:875–881
304. YLI-MATTILA, T., S. PAAVANEN-HUHTALA, ET AL. 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41(4):243-260.
305. YLI-MATTILA, T., GAGKAEVA, T., WARD, T.J., AOKI, T., KISTLER, H.C., O'DONNELL, K., 2009. A novel asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the russian far east. *Mycologia* 101, 841–852.
306. YODER, W.T., ET CHRISTIANSON, L.M. 1998. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*: taxonomic status of the edible "Quorn" fungus reevaluated. *Fungal Genetics and Biology* 23 : 68-80.
307. ZADOKS, J.C., CHANG, T.T., KONZAK, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14,415–421.
308. ZAGHOUANE.O; AMRANI.R ET AMRANI.M. 2013. Production céréalière de la campagne 2012/2013 par espèce. Bulletin des grandes cultures. Ed. ITGC. 8p
309. ZHANG, H., VAN DER LEE, T., WAALWIJK, C., CHEN, W., XU, J., ZHANG, Y. & FENG, J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS ONE*,7, 20.

Publications scientifiques

Sihem Touati-Hattab, Christian Barreau, Marie-Noelle Verdal-Bonnin, Sylvain Chereau, Florence Richard-Forget, S.Hadjout, Leila Mekliche and Zouaoui Bouznad 2016.

Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*.

DOI 10.1007/s10658-016-0869-y

S. Hadjout, S. Chéreau, V. Atanasova-Pénichon, G. Marchegay, L. Mekliche, H. Boureghda, C. Barreau, S. Touati-Hattab, Z. Bouznad and F. Richard-Forget 2017

Phenotypic and biochemical characterization of new advanced durum wheat breeding lines from Algeria that show resistance to *Fusarium* head blight and to mycotoxin accumulation *Journal of Plant Pathology* . **99** (3), 671-680

Communications Scientifiques

Communications orales

Hattab S. Les maladies fongiques des céréales. Cours international sur les maladies des céréales à l'ITGC El Harrach Alger. 21-24 Avril 1999.

S.Touati-Hattab¹, C. Barreau², Z.Bouznad³ *Fusarium* head blight on wheat in Algeria: investigations on isolates and cultivars resistance. *12th European Fusarium Seminar* Bordeaux, France, 12-16 mai 2013.

Touati-Hattab S. Pathogénicité, production de trichotécènes par *Fusarium culmorum* et évaluation de la résistance des variétés de blés cultivées en Algérie. *work shop* les Fusaria et les mycotoxines associées, un danger pour la filière blé. Avancées scientifiques et perspectives. ENSA EL HARRACH. 22-26 novembbre 2015.

Présentations poster

Touati-Hattab S¹; Hadjout S.²; L. Mekliche; Kedad A.²; Bouznad Z.² and Barreau C.³ *Fusarium* Head Blight of Wheat in Algeria: level of grains contamination and evaluation of wheat cultivars for resistance to *F. culmorum* and *F. Graminearum*. *12th European Fusarium Seminar* Bordeaux, France, 12-16 mai 2013.

Annexe 1 : Composition des différents milieux d'isolement et de culture

DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar)

Pour un litre de milieu :

- peptone bactériologique : 15 g
- K₂HPO₄ : 1 g
- MgSO₄.7H₂O : 0,5 g
- Chloramphénicol : 0,2 g
- dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution alcoolique* : 1 ml.
- crystal violet en solution aqueuse** : 1 ml
- agar : 15 g
- H₂O distillée : 1000 ml

* : 0.2 g de dichloran dans 100 ml d'éthanol

** : 50 mg de crystal violet dans 100 ml d'eau distillée

SNA (Synthetisher Nährstoffärmer Agar)

Pour un litre de milieu :

- K₂HPO₄ : 1 g
- KNO₃ : 1 g
- MgSO₄.7H₂O : 0,5 g
- KCl : 0,5 g
- Glucose : 0,2 g
- Saccharose : 0,2 g
- Agar : 20 g
- H₂O distillée : 1000 ml

PDA (Potato Dextrose Agar)

Pour un litre de milieu :

- Agar agar 20 g
- Pomme de terre 200 g
- Dextrose 20 g
- Eau distillée 1000 ml

RESUME

La Fusariose de l'épi (FHB) est une maladie du blé qui a été étudiée dans le monde entier. Mais peu de travaux sont réalisés en Algérie, où des quantités importantes de blé dur et blé tendre sont cultivées et traditionnellement consommées sous forme de semoule et de pain. Cette maladie est responsable de pertes considérables de production. Les espèces impliquées peuvent conduire à la contamination des grains par diverses mycotoxines, qui sont dangereuses pour la santé humaine et animale.

L'objectif de ce travail de thèse s'attachera ainsi à identifier la flore fusarienne toxigène présente sur les épis de blé Algériens et de caractériser la capacité des isolats de *F. culmorum* à produire des mycotoxines in vitro. Nous nous sommes intéressés aussi au chemotypage et quantification de Potentiel toxigène des isolats de *F. Culmorum*.

L'identification moléculaire par PCR spécifique a confirmé l'identification morphologique, et a permis de montrer l'implication de 5 espèces à savoir *F. culmorum*, *F.pseudograminearum*, *F. graminearum* , et *F. avenaceum*.
F. culmorum semble être le pathogène majeur associé à ces maladies en Algérie.

Le chémotype de 40 isolats de *F.culmorum* a été identifié par la réalisation de (PCR) et (PCR-Q). Les résultats ont montré que tous les isolats testés sont potentiellement toxigènes. Par ailleurs, l'amplification des *Tri12* 3ADON et *Tri12* NIV montrent une dominance de 95% des isolats du type DON, et seulement 5% sur les 40 isolats se sont avérés de chémotype NIV.

Le chémotype de 4 isolats de *F.culmorum* a été confirmé par la réalisation d'une PCR Taq Man à l'aide d'une sonde spécifique des deux « chémotype » connus chez *F. culmorum*. Les résultats obtenus suggèrent que deux isolats sont de chémotype NIV/FX et les deux autres isolats sont de chémotype DON)/ 3-ADON. les analyses des TCTB par HPLC/DAD ont permis de déterminer leur potentiel toxigène, les deux isolats de chémotype DON/3-ADON produisent des niveaux de toxines bien supérieurs à ceux des 2 isolats NIV/FX.

ces 4 souches se sont avérées être pathogènes sur des épis de blé de différentes variétés. Par la suite ces souches ont servi pendant deux ans à évaluer en plein champ le comportement

de quatre variétés de blé dur, quatre variétés de blé tendre d'origine autochtone et introduite et deux nouvelles lignées de blé dur. Les résultats montrent une corrélation entre le niveau d'envahissement du grain et la quantité de toxine accumulée avec une grande diversité selon le cultivar, deux variétés locale de blé dur et les deux nouvelles lignées de blé dur ont montré un niveau prometteur de résistance à la fusariose avec une accumulation de trichothécène significativement plus faible.

Enfin, les acides phénoliques ont été évaluées dans l'ensemble des variétés et des lignées pour voir si leur contenu pourrait être lié à l'accumulation de toxines. Il s'agit du premier rapport évaluant les variétés de blé plus fréquemment cultivé en Algérie pour leur sensibilité à la fusariose causées par des souches locales de *F. culmorum* dans un tel état bioclimatique semi-arid.

Mots clés: Blé, *Fusarium* head blight, chymotypage , *F. culmorum*, trichothécènes type B, variétés, résistance

ABSTRACT

Fusarium head blight (FHB) is a major disease of wheat that has been studied worldwide but few works are carried out in Algeria, where high quantities of both durum wheat and common soft wheat are grown and traditionally consumed as semolina and bread. The Fusarium ear blight in cereal or (FHB), which is responsible for considerable loss of production. The *Fusarium* species that causes this disease lead to the contamination of grains by diverse mycotoxins, which are dangerous for human and animal health.

The objectives of this study were to identify toxigenic *Fusarium* species on wheat from Algerian climatic area and to characterise the isolates of *F. culmorum* to produce mycotoxins *in vitro*, the chymotypage and the potential toxinogene were also studied.

The molecular identification by specific PCR confirmed the morphological identification, revealed the presence of five species *F. culmorum*, *F.pseudograminearum*, *F. graminearum*, et *F. avenaceum*. *F. culmorum*. Here we show that *Fusarium culmorum* seems to be the major pathogen associated with these diseases in Algeria.

The molecular chemotype (PCR) and (Q-PCR) of a collection of 40 isolates was realized. The results indicated that all isolates tested are potentially toxinogenes. The results of amplification of the Tri12 3Adon and Tri12 Niv revealed, the presence of both chemotype types DON and Niv representing approximately 5% and 95% of the analyzed isolates .

The type of mycotoxins produced by four *F. culmorum* isolates was evaluated by molecular chemotype (Taq Man PCR) and biochemical (HPLC). Two strains produced deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone *in vitro*. The two other strains produced nivalenol and fusarenone X. The two DON/3-ADON isolates produce significantly higher levels of toxin than the NIV/FX isolates.

The four strains were used for artificial spray inoculations on wheat spikes to determine their potential in generating FHB symptoms and accumulating mycotoxins in local field conditions. A panel constituted of four durum wheat and four soft wheat varieties generally cultivated in Algeria and of two newly created durum wheat lines were evaluated. The results show a correlation between the level of invasion of the grain and the quantity of accumulated toxins with a large diversity depending on the cultivars. Interestingly, two local durum wheat varieties and the two new durum lines showed a promising level of resistance to FHB with significantly lower trichothecene accumulation.

The content in phenolic compounds of the different varieties was assessed and evaluated as possible factor of resistance to trichothecene accumulation. This is the first report evaluating the wheat varieties cultivated in Algeria for their susceptibility to Fusarium Head Blight caused by local strains of *F. culmorum* in semi-arid bioclimatic condition.

Keywords: Wheat, Fusarium head blight, chemotype, *F. culmorum*, type B trichothecenes, variety, resistance .

Publications scientifiques

Sihem Touati-Hattab, Christian Barreau, Marie-Noelle Verdal-Bonnin, Sylvain Chereau, Florence Richard-Forget, S.Hadjout, Leila Mekliche and Zouaoui Bouznad 2016.

Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*.

DOI 10.1007/s10658-016-0869-y

S. Hadjout, S. Chéreau, V. Atanasova-Pénichon, G. Marchegay, L. Mekliche, H. Boureghda, C. Barreau, S. Touati-Hattab, Z. Bouznad and F. Richard-Forget 2017

Phenotypic and biochemical characterization of new advanced durum wheat breeding lines from Algeria that show resistance to *Fusarium* head blight and to mycotoxin accumulation *Journal of Plant Pathology* . **99** (3), 671-680

Communications Scientifiques

Communications orales

Hattab S. Les maladies fongiques des céréales. Cours international sur les maladies des céréales à l'ITGC El Harrach Alger. 21-24 Avril 1999.

S.Touati-Hattab¹, C. Barreau², Z.Bouznad³ *Fusarium* head blight on wheat in Algeria: investigations on isolates and cultivars resistance. *12th European Fusarium Seminar* Bordeaux, France, 12-16 mai 2013.

Touati-Hattab S. Pathogénicité, production de trichotécènes par *Fusarium culmorum* et évaluation de la résistance des variétés de blés cultivées en Algérie. *work shop* les Fusaria et les mycotoxines associées, un danger pour la filière blé. Avancées scientifiques et perspectives. ENSA EL HARRACH. 22-26 novembre 2015.

Présentations poster

Touati-Hattab S¹; Hadjout S.²; L. Mekliche; Kedad A.²; Bouznad Z.² and Barreau C.³

Fusarium Head Blight of Wheat in Algeria: level of grains contamination and evaluation of wheat cultivars for resistance to *F. culmorum* and *F. Graminearum*. *12th European Fusarium Seminar* Bordeaux, France, 12-16 mai 2013.

Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria

Sihem Touati-Hattab · Christian Barreau · Marie-Noelle Verdal-Bonnin ·
Sylvain Chereau · Florence Richard-Forget · S. Hadjout · Leila Mekliche ·
Zouaoui Bouznad

Accepted: 21 January 2016

© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2016

Abstract *Fusarium* head blight (FHB) is a major disease of wheat that has been studied worldwide but never in Algeria where high quantities of both durum wheat and common soft wheat are grown and traditionally consumed as semolina and bread. *Fusarium* root rot has also been observed in this country. Here we show that *Fusarium culmorum* seems to be the major pathogen associated with these diseases in Algeria. The type of mycotoxins produced by four *F. culmorum* isolates and their capacity to confer the disease on spike and accumulate type B trichothecenes in the grain was evaluated. Two strains produced deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone in vitro. The two other strains produced nivalenol and fusarenone X. The four strains were used for artificial spray inoculations on wheat spikes to determine their potential in generating FHB symptoms and accumulating mycotoxins in local field conditions. A panel constituted of

four durum wheat and four soft wheat varieties generally cultivated in Algeria and of two newly created durum wheat lines were evaluated. The results show a correlation between the level of invasion of the grain and the quantity of accumulated toxins with a large diversity depending on the cultivars. Interestingly, two local durum wheat varieties and the two new durum lines showed a promising level of resistance to FHB with significantly lower trichothecene accumulation. The content in phenolic compounds of the different varieties was assessed and evaluated as possible factor of resistance to trichothecene accumulation. This is the first report evaluating the wheat varieties cultivated in Algeria for their susceptibility to *Fusarium* Head Blight caused by local strains of *F. culmorum* in semi-arid bioclimatic condition.

Keywords Wheat · *Fusarium* head blight · *F. culmorum* · Type B trichothecenes · Variety · Resistance

S. Touati-Hattab (✉)
Amar Telidji University, Laghouat, Algeria
e-mail: s.hattab@lagh-univ.dz

S. Touati-Hattab
e-mail: touatishem@yahoo.fr

C. Barreau · M.-N. Verdal-Bonnin · S. Chereau ·
F. Richard-Forget
Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UR1264,
MycSA, Bordeaux, France

S. Hadjout · L. Mekliche · Z. Bouznad
National Schools of Agronomy, ENSA, Algiers, Algeria

Introduction

Durum wheat is commonly used in Algeria to prepare the popular semolina used for couscous preparation. For this reason, it has been traditionally cultivated in all the regions where climatic conditions allow the growth of this cereal. Wheat is grown throughout the different agro-ecological areas of Algeria, but it is essentially concentrated in semi-arid and arid areas (Boulal et al. 2007). The areas reserved annually to cereal can reach 6

million hectares. Approximately one third of this surface is located in bioclimatic areas with an annual average rainfall greater than 450 mm (Feliachi et al. 2001). Durum wheat is cultivated approximately in 1.1 million hectares and its production was 1530 kg/ha in 2010 (Hamadache 2013).

Fusarium head blight (FHB) affecting the spike and Fusarium foot and root rot (FFR) (also known as the Fusarium crown root of wheat) are two types of devastating cereal diseases worldwide. These two diseases have also recently been observed on wheat in Algeria where they are caused mostly by the two *Fusarium* species: *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* (Bouregghda 2009).

FFR causes browning of wheat seedling, brown discoloration of sub-crown internodes and formation of bleached heads. Generally, the economic importance of the disease has been linked to environmental conditions. This disease has been reported as affecting wheat in South Africa (Klaassen et al. 1991; Lamprech et al. 2006), Iran (Saremi et al. 2007), many Mediterranean countries (Balmas et al. 2015), Australia (Akinsanmi et al. 2006; Murray and Brennan 2009), West Asia (Hogg et al. 2010) and USA (Smiley and Patterson 1996). It has been recently reported that FFR may be responsible for as much as 50 % of production losses (Hollaway et al. 2013). Mostly, four pathogenic species including *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* and *F. graminearum* have been reported as responsible for root rot and crown rot.

Fusarium head blight (FHB) has been extensively studied worldwide (Parry et al. 1995; Xu and Berrie 2005). Economical losses caused by FHB due to poor yield and mycotoxins contamination was estimated to 6 billion \$ in the US between 1993 and 2001 (Obanor and Chakraborty 2014). In addition to cause significant yield loss, FHB is of greater significance because it is often associated with kernel contamination by trichothecenes and zearalenone, two *Fusarium* mycotoxins produced in the field (Bottalico 1998). The most important pathogens responsible for FHB are *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* and *F. poae*, which can produce a range of different trichothecene molecules and also zearalenone (Bottalico and Perrone 2002) and *Microdochium nivale* (formerly *M. nivale* var. *nivale* and var. *majus*) (Glynn et al. 2005), which do not produce known mycotoxins. Among *Fusarium* mycotoxins, trichothecenes are frequently encountered on cereal crops in all parts of the world including North

and South America, all Europe, Australia, South Africa, Japan and China (Bianchini et al. 2015). Trichothecenes are heat stable molecules and are not degraded during current food processing (Hazel and Patel 2004; Rocha et al. 2005). As these are potent inhibitors of eukaryotic protein synthesis (Rocha et al. 2005) and have a large range of undesirable effects, they constitute a toxin family of considerable concern to human and animal health (Bennett and Klich 2003). Type B trichothecenes (TCT B) are the major mycotoxins produced in cereals mainly by *F. culmorum* and *F. graminearum* as well as some other species of *Fusarium* (Desjardins 2006; Kimura et al. 2007). They include deoxynivalenol (DON) and its acetylated forms 3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol (3- and 15-ADON), and nivalenol (NIV) and its acetylated form 4-acetylnivalenol or fusarenone X (FX) (Balzer et al. 2004; Bennett and Klich 2003; Sweeney and Dobson 1999). In Europe, maximum acceptable DON levels in food destined for human consumption were established (EC N°1881/2006). Accordingly, grains exceeding the established limits are not permitted for commercialization to human consumption. Currently in Algeria, there are no standards or regulatory limits fixing maximum levels of mycotoxins in food and feed.

The production of DON by *F. graminearum* has been shown to play a role in the progression of the disease from one spikelet to another through the rachis (Maier et al. 2006) and is a determinant of aggressiveness (Eudes et al. 2001; Proctor et al. 1995). Other reports suggest that the production of DON by *F. culmorum* also correlates with aggressiveness (Eudes et al. 2001; Hestbjerg et al. 2002; Miedaner et al. 2000), but the relationship between disease symptoms and DON content is not yet well understood. Today, the quantification of fungal ergosterol allows determining more precisely the quantity of pathogen development in the grain (Seitz et al. 1977; Schwadorf and Muller 1989). The development of quantitative PCR of DNA extracted from contaminated grains to assess the biomass of the fungus and of multi-toxin analyses using HPLC/MS technology for precise quantification of the toxin also contributed to improve the characterisation of the resistance level of wheat varieties and help understanding the factors that influence FHB. Such knowledge is determinant for the elaboration of strategies to reduce the risk of mycotoxin contamination of grains and foodstuffs.

The more promising way to prevent, or at least limit, trichothecenes occurrence in food and feedstuff is to

reduce their biosynthesis in the grain by the fungus before harvest. One of the best environmentally friendly and efficient strategy is breeding, selecting for varieties exhibiting natural mechanisms of plant resistance to both fungal spread and mycotoxin accumulation. Cereals can deploy various natural mechanisms to reduce mycotoxin accumulation. Among these natural mechanisms, the cereal plants can promote degradation or detoxification of mycotoxins (type V-1 resistance) or prevent their biosynthesis (type V-2 resistance) (Boutigny et al. 2008). The hypothesis was previously raised that resistance to *Fusarium* trichothecene accumulation in some durum wheat cultivars could be explained by a particular biochemical composition of the kernel, rich in specific endogenous compounds able to reduce trichothecene biosynthesis (Pinson-Gadais et al. 2007). Several reports suggest that resistance to *Fusarium* and toxin accumulation could be correlated with kernel phenolic content at maturity in maize (Assabgui et al. 1993; Bily et al. 2003; Reid et al. 1992) and wheat (McKeehen et al. 1999; Siranidou et al. 2002). More recent work showed that a phenolic fraction extracted from wheat bran exhibited a strong inhibitory effect on DON/ADON biosynthesis in vitro by *F. culmorum* (Boutigny et al. 2010) and strengthened the hypothesis of a possible role of phenolic compounds in resistance to trichothecene accumulation in durum wheat (Boutigny et al. 2009; Boutigny et al. 2008; Atanasova-Pénichon et al. 2012).

The objectives of this study were to identify isolates of *F. culmorum* from Algerian climatic area and to characterise their capacity to produce mycotoxins in vitro. These Algerian strains were shown to be pathogenic toward wheat spikes of different varieties. Afterward, these strains were used during 2 years to assess in field conditions the behaviour of eight winter wheat varieties belonging to both soft wheat and durum wheat from indigenous or abroad origin. Not only resistance to FHB caused by *F. culmorum* but also the corresponding accumulation of trichothecenes and development of the fungus in the grain were evaluated. In addition, two new durum wheat lines were also assessed and shown to be potentially more resistant to *Fusarium* than all the varieties tested. Finally, phenolic acids were assessed in the set of varieties and lines to see if their content could be related to toxin accumulation. This is the first report evaluating the most frequently cultivated wheat varieties in Algeria for their susceptibility to *Fusarium*

Head Blight caused by local strains of *F. culmorum* in such bioclimatic semi-arid condition.

Materials and methods

Fungal isolates

Four single-spore isolates (BT11, BD11, T5 06, T7 06) of *Fusarium species* were used for inoculation in the field (Table 1). These isolates were from durum wheat grains collected in Oued Smar and Rouiba located at the North of Algeria close to Algiers (S. Touati; unpublished results). They were identified as *F. culmorum* on the basis of conidial morphology according to Leslie and Summerell (Leslie and Summerell 2006).

Plant materials

Four semi late and four early wheat genotypes with different levels of resistance to FHB were used. They belong to winter durum (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) and soft wheat (*Triticum aestivum*). Two wheat lines and two of their parent lines were also tested in the second year. Basic plots were established at the experimental farm of ENSA El Harrach. Four trials were two meters spaced and forty meters away from the test with control varieties. Each test is constituted of three blocks with 1 m spacing between the blocks, eight micro-plots of four lines with a 50 cm space between micro-plots. The seedling rate was ten seeds/line, 40 seeds/ μ -plot. Inoculations were performed at anthesis (Zadoks et al. 1974) and the harvest was made at physiological maturity.

The inoculum was produced from four single-spore isolates of *F. culmorum* maintained on PDA plates at 4 °C for 10 days. Multiplication of the fungus to produce the required amount of inoculum for contamination of the plots was made with 60 plates/test. The mycelium was scraped and agar was ground in a blender with distilled water. After vortexing for 5 min, the solution was filtered through Nitex Sefar 100 μ m in a bottle 1000 ml. Concentration of the spore suspension was assessed with a Malassez cell and was adjusted to the desired final concentration of 10^6 spores/ml. Spray inoculations were made at full anthesis (stage 67–68), but they were not performed on the same day for all cultivars, as intervals of up to 15 days occurred between the early and late varieties. After inoculation, a sprinkler

Table 1 characteristics of the Algerian isolates of *Fusarium culmorum* used in the field experiments

Name	Species	Origin	Variety	Toxin produced (a)				DI%(b)		
				DON µg/g	3-ADON µg/g	NIV µg/g	Fx µg/g	ZEA µg/g	ARZ (SW)	VITRON (DW)
BD11	<i>F. culmorum</i>	Rouiba	Vitron (DW)	340.5 ± 5.9	284.2 ± 0.2	nd	nd	3179.3 ± 134.9	55.25 %	70.00 %
BT11	<i>F. culmorum</i>	Rouiba	Anza (SW)	89.0 ± 9.9	52.6 ± 0.1	nd	nd	222.2 ± 26.5	52.50 %	62.50 %
T5 06	<i>F. culmorum</i>	Oued Smar	Vitron (DW)	nd	nd	5.1 ± 1.0	7.9 ± 1.2	nd	43.50 %	52.50 %
T7 06	<i>F. culmorum</i>	Oued Smar	Vitron (DW)	nd	nd	38.4 ± 4.7	15.2 ± 1.2	nd	48.75 %	59.25 %

a: main toxin produced on rice grains; b: primarily pathogenicity assay made in 2011, *DI* Disease Index, *SW* soft wheat, *DW* durum wheat, *DON* Deoxynivalenol, *3-ADON* 3-acetyldeoxynivalenol, *NIV* Nivalenol, *FX* Fusarenone X, *ZEA* Zearalenone

irrigation system was set up, with applications every 30 min for 20 s and 24 applications per day until maturity of the ears.

Examination of FHB resistance traits

Head blight symptoms of wheat were evaluated 21 days after inoculation. The percentage of infected spikelets was evaluated from 100 spikes issued from each plot. The value obtained was defined as the disease index (DI). In total, up to 220 wheat samples issued from the field artificial inoculations were analysed during the two 2012 and 2013 years.

Fusarium culmorum species-specific PCR

For DNA extraction, the isolates of *F. culmorum* were grown on potato dextrose agar medium (PDA) for 7 days. The mycelia were freeze-dried and ground to a fine powder. DNA was extracted by using a method adapted from Lamprecht et al. (1992). The DNA samples were amplified by PCR using the species-specific primers OPT18F/OPT18R (GATGCCAGACCAA GACGAAG/GATGCCAGACCAAGACGAAG) (Schilling et al. 1996). The amplification conditions were: 20 ng of fungal DNA, 1 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1 unit of GoTaq[®] DNA polymerase (Promega, USA), 1X PCR polymerase reaction buffer, and 0.25 µM of each forward and reverse primer. DNA amplification was performed in an iCycler[™] (Bio-Rad) as described by Schilling et al. (1996). PCR assays with the primers Tox5 developed for the gene Tri5 were used to confirm the potential ability of the isolates to produce trichothecenes as described by the authors (Niessen and Vogel 1998). Primers specific for the sequence of Tri 12 gene of each chemotype were used to characterise NIV and DON producing chemotypes (L. Pinson Gadais, personal communication). The cycling protocol for identifying the NIV/FX chemotype was: Primer Tri12NivFx F and R (20 µm) with pre-incubation (1 cycle of 10 min at 95 °C) followed by amplification (45 cycles of 10 s at 95 °C, 40 s at 58 °C and 30s at 72 °C) followed by a final extension phase of 5mn at 72 °C. For identifying the 3-ADON chemotype, the primers Tri12DON3Adon F and R were used at 20 µm with one cycle at 94 °C for 10 min, then 45 cycles of 95 °C for 10s, 65 °C for 40s and 72 °C for 30s followed by a final extension step of 72 °C for 5 min.

Culture on rice grains and toxins extraction

Toxin production by *Fusarium* strains was assessed on autoclaved rice grains. Rice used as the substrate was previously analysed for DON, NIV, 15-ADON, 3-ADON and FX content and found to no contain detectable levels of. Toxin. Before inoculation, rice was moistened with sterile distilled water to a water activity (a_w) of 0.99. Rice grains (110 g) were placed in a 500 ml Erlenmeyer flask, and autoclaved twice for 25 min at 110 °C as described by Bakan et al. (2001). Each flask was inoculated with 0.5 ml of an aqueous suspension of 10^4 conidia/ml harvested from 9 day-old cultures grown on PDA slant. Three flasks were inoculated for each strain. The flasks were incubated without shaking at 25 °C for 3 week in the dark. At the end of incubation, the culture material was dried in a forced-air oven at 50 °C for 72 h. The grains were homogenized and ground into a fine powder (particles size were about 100 μ m). The controls were treated in the same way except that they were not inoculated. For analysis, a 5 g portion of each ground sample was extracted with 20 ml of acetonitrile:water (84:16, v/v). After agitation for 1 h followed by a centrifugation, 3 ml of the filtrate were purified using Trichothecene P columns (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). The eluate was evaporated to dryness at 50 °C under a nitrogen stream. The samples were stored at -20 °C pending analysis.

Quantification of type B trichothecenes (TCTB) and zearalenone (ZEA)

The dried samples were defrost at room temperature and directly suspended in 100 μ l of methanol/water (1:1, v/v) (Methanol Fisher Scientific, Waltham, USA) and filtered through a 0.45 μ m-pore-size Millipore filter. Quantification was performed as described previously (Montibus et al. 2013) on an Agilent Technologies 1100 series HPLC chain, equipped with an Agilent photodiode array detector (DAD) and the ChemStation chromatography manager software (Agilent, Waldbronn, Germany). Separation was achieved on a column kinetex 2.6 U XB-C18 (4.6 \times 150 mm) maintained at 45 °C. The mobile phase consisted of water acidified with orthophosphoric acid to reach pH 2.6 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow was kept at 1 ml/min for a total run time of 27 min. The injection volume was set to 5 μ l. TCTB were separated in gradient elution as follows: 93–7 % B, 70–30 % B in 10 min, 10–90 % B

in 25 min, 93–7 % B in 12 min. UV-VIS spectra were measured from 220 to 550 nm and peak areas were measured at 230 nm. Quantification was performed using external calibration with standard solutions prepared from pure powders (Sigma Aldrich®, Saint-Louis, USA). The detection limit was 100 μ g/kg for each of the toxins.

Quantification of DON-Glu by LC-MS/MS analysis

Extraction was performed exactly as for trichothecenes. Before LC-MS/MS analysis the dry residue was suspended in 300 μ l of methanol/water (1:1, v/v). Quantification of trichothecene glycoside was performed using a QTrap 2000 LC/MS/MS system (Applied Biosystems) equipped with a 1100 Series HPLC system (Agilent), a reverse phase Kinetex™ 2.6 μ m XB-C18 column (150 \times 4.6 mm, Phenomenex; France) maintained at 45 °C and a TurboIonSpray ESI source. Solvent A consisted of methanol/water (10/90, v/v) and solvent B consisted of methanol/water (90/10, v/v). The flow rate was kept at 700 μ l/min and was split so that 300 μ L/min went to the electrospray source. Gradient elution was performed with the following conditions: 4 min with a linear gradient from 80 % to 5 % A, 4 min held at 5 % A, 1 min linear gradient from 5 % to 80 % A and 80 % A for 8 min post run reconditioning. The injection volume was 10 μ l. The electrospray interface was used in the negative ion mode at 400 °C with the following settings: curtain gas, 20 p.s.i.; nebulizer gas, 30 p.s.i.; auxiliary gas, 70 p.s.i.; ion spray voltage, -4200 V; declustering potential, -30 V; entrance potential, -10 V; collision energy, -30 eV; collision-activated dissociation gas, medium. Quantification was performed using external calibration with DON (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and DON-3-O-glucose (Sigma-Aldrich, Lyon, France) standard solutions, ranging from 10 to 1000 ng/ml.

Quantification of ergosterol

The extraction method and assay of ergosterol was adapted from Saraf (Saraf et al. 1997) and Marin (Marin et al. 2005). It was conducted as follow: In a tube, 30 mg of ground grain were added to 2 ml of potassium hydroxide/methanol solution (1:10, w/v). After 1 h at 80 °C, the tube was rapidly cooled on ice. An internal standard constituted of 40 μ l of 7-dehydrocholesterol (Sigma, France) dissolved in

methanol at 500 mg/ml and mixed with 1 ml of ultrapure water was added to the sample. Extraction was carried out twice with 2 ml of hexane. After centrifugation at 3000 rpm for 3 min, the two organic phases were collected, grouped and evaporated to dryness under a nitrogen flow at room temperature. The dried extracts were then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The dried samples were suspended in 1 ml of methanol and filtered through a 0.45 mm filter before HPLC/DAD analysis. Ergosterol elution is conducted on a column Kinetex 2.6 μx B C18 - 100 A (150 mm \times 4, 6) (Phenomenex; France) maintained at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. The injection volume was set at 5 μl . An isocratic elution with 100 % methanol was used. The flow rate was set at 0.8 ml/min for a total analysis time of 15 min. UV spectrum was measured from 190 to 400 nm and the identification of ergosterol was done using its specific maximum of absorbance at 282 nm. Quantification was done using external calibration obtained from the pure standard of ergosterol (Fulka, France).

Extraction and analysis of phenolic acids from kernels

Phenolic acids were released from cell walls by alkaline hydrolysis. Four milliliters of sodium hydroxide (2 M) were added to finely grinded wheat kernels (100 mg). After agitation for 2 h, the filtrates were acidified to pH 2 with hydrochloric acid (12 M). Samples were extracted with 5 ml of ethyl acetate. After centrifugation (5000 rpm), 4 ml of the ethyl acetate fraction was collected. The extraction was repeated a second time and 8 ml of organic fraction evaporated to dryness at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ under nitrogen stream. Finally, dried samples were dissolved in 100 μl of methanol/water (50:50, v/v) before analysis. HPLC/DAD separation was performed according to a previously described procedure (Atanasova-Pénichon et al. 2014) with some modifications. Separation of phenolic acids was achieved on a KINETEX 2.6 U XB-C18 column (4.6 \times 150 mm) (Phenomenex, France) maintained at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. The mobile phase consisted of 2 % formic acid in water (v/v) (solvent A) and acetonitrile (solvent B). Phenolic acids were separated by a gradient elution as follows: from 5 to 15 % B in 30 min, from 15 to 50 % B in 10 min, from 50 to 90 % B in 5 min, 90 % B for 3 min, 90 to 5 % B in 2 min, and 5 % B for 10 min for post-run reconditioning. The injection volume was 5 μl and the flow rate was kept at 1 ml/min. The UV-VIS spectra were recorded from 200 to 550 nm and peak areas were measured at

260 nm, 280 nm and 320 nm and 360 according to the studied phenolic acid. Quantification was performed by using external calibrations with phenolic acid standard solutions prepared from commercial pure powders purchased from Sigma-Aldrich (France).

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with STATBOX Vegetal 7.2. Significance of mean differences were determined using the Tukey's test, and responses were judged significant at the 5 % level ($p = 0.05$) with a 95 % confidence interval, and the multiple comparison of means (CMM) for DI, EI and TCTB were determined using the Newman - Keuls test at 5 %. The correlation between DI, Ergo and mycotoxin accumulation in kernels were determined by Pearson correlation analysis and calculated using: XLSTAT software (PCA).

Results

Molecular and biochemical characterisation of the *Fusarium culmorum* strains

Four *Fusarium* strains were selected among a collection of isolates issued from wheat spikes of durum wheat collected in different area of the north of Algeria. The four strains were characterised as *F. culmorum* on the basis of morphological observation of mycelia on PDA plates and after observation of conidia under a microscope according to Leslie and Summerell (Leslie and Summerell 2006). Morphological identification of the isolates at the species level was confirmed by PCR using the specific primers described by Shilling et al. (1996). Analysis of the PCR product showed a fragment of 470 bp as expected for *F. culmorum* (result not shown). PCR assays with primer Tox5 specific of the gene *Tri5* were used to confirm the potential ability of the four isolates to produce trichothecenes B (Niessen and Vogel 1998). Specific PCR assays were used to determine the potential chemotype of each *F. culmorum* isolate by a genetic approach based on the use of primers specific of the *Tri12* genes sequence (L. Pinson-Gadais; personal communication). Results showed the two isolates BT11 and BD11 yielded a 282 bp fragment with the *Tri12*DON3Adon assay indicating a DON/3-ADON genotype. The two other isolates T5 06 and T7

06 yielded specific PCR products with the Tri12NivFX assay (465 bp) indicative of NIV producers.

The toxins produced when the four strains were grown in vitro on rice grains were analysed. The amounts of mycotoxins synthesised by *F. culmorum* BT11 and BD11 strains was deoxynivalenol (DON) and its acetylated form 3-ADON confirming the DON/3-ADON chemotype as determined by PCR. In addition, these two strains produced also large amounts of zearalenone (ZEA) on the rice substrate (Table 1). The strains T5 06 and T7 06 were confirmed as NIV/FX chemotype as they produced nivalenol (NIV) and its acetylated form fusarenone (FX). No ZEA was detected for these two strains. This definitely confirms the chemotype of the four isolates and characterise their toxigenic potential in vitro. The two DON/3-ADON isolates produce toxins levels well above those of the NIV/FX isolates and, in addition, the strain BD11 produces very high amounts of ZEA on rice substrate.

Pathogenicity and aggressiveness of the four *F. culmorum* isolates in field assay on wheat

The two most important commercial wheat types are the durum wheat (DW) *Triticum durum* L. subsp. *Durum* and the soft wheat (SW) *Triticum aestivum* L. In Algeria, 12 varieties are currently cultivated for production of durum wheat. Since 1980, five of these varieties have been introduced as improved material. Today, the two introduced varieties VITRON and WAHA occupy up to 65 % of the total cultivated areas. Furthermore, growth of the more recently introduced variety “CHEN’s” has increased in the recent years to up to a level of 7 % of the durum wheat seed sole occupancy (Boufnar-Zaghouane and Zaghouane 2006). In our assay, we evaluated the resistance to *F. culmorum* infection for the two types of durum wheat cultivars including both the autochthon cultivars and the introduced varieties. This information is a prerequisite to the development of improved genetic material with effective resistance to FHB. For the comparison, we also used a few common soft wheat varieties grown in Algeria as summarised in Table 2. In a primarily assay performed in 2011, the four *F. culmorum* strains were evaluated for their capacity to confer FHB in field experiments. They were spray inoculated on spikes using VITRON, a variety of durum wheat and ARZ, a variety of soft wheat (Table 2). The four T5 06, T7 06, BT11 and BD 11 strains where pathogenic giving

slightly different Disease Index (DI) increasing from 43.5 % to 55.25 for the soft wheat variety ARZ and from 52.5 to up to 70 % for the durum wheat variety VITRON (Table 1). The four isolates were then used as reference strains for the evaluation of resistance of a set of eight wheat varieties. Spray inoculation onto spikes was used for the determination of the pathogenicity and evaluation of respective aggressiveness of the four *F. culmorum* strains. Four were semi late varieties and four were early genotypes and they were chosen as representative of the endogenous and introduced varieties generally used in Algeria (Table 2). The assays were performed for the 2 years 2012 and 2013, and a control assay was performed for each variety. Disease index (DI), ergosterol content reflecting the development of the fungus in the grain (hereby called the Ergosterol Index (EI)) and mycotoxins contents were also evaluated for the 2 years. The results are reported in Tables 3 and 4.

Correlations between variables

It is noteworthy that the present results from field assays are based on 2-year studies and variables are calculated on the results of the two cumulative years. Overall, the disease index DI was found highly correlated to EI, the fungal ergosterol content, and to the toxin content in the four assays ($r = 0.9$, $r = 0.88$; $r = 0.85$, $r = 0.9$; $r = 0.77$, $r = 0.72$; $r = 0.70$, $r = 0.69$ respectively for T5 06, T7 06, BT11 and BD11). As well, the toxin content was found highly correlated to the EI for T5 06 and T7 06 assays $r = 0.87$ and $r = 0.88$ respectively and it was correlated only with an $r = 0.37$ for BT11 and an $r = 0.41$ for BD11. These relationships were further explored with a variance analysis ANOVA. For the three variables DI, EI and TCTB, the analysis of variance gives highly significant results for the factor 1 (variety), factor 2 (isolate) and the F1 * F2 interaction ($p < 0.0001$). The variability between blocks is non-significant, suggesting that the blocks are homogeneous. Both strains and varieties had a significant effect on DI, EI and on toxin content. The disease index DI appears to be a good indicator of the aggressiveness of the strain and, of the impact on its development in grains (fungal biomass represented by the ergosterol index EI) and its production of toxins in grain. Regarding the control experiments, our results showed only a very low natural contamination for VITRON in 2012 and the fungal levels of ergosterol were below the detection limit of our method.

Table 2 Different varieties and lines used in the field assays

Name of genotype	Short Name used	Specie	Origin	Vegetative cycle
ARZ	ARZ	SW	Local	Semi-early
HD1220	HD1220	SW	Local	Early
Florence Aurore	FLORENCE	SW	FRANCE	Late
Mahon Demias	MAHON	SW	SPAIN	Late
Mohammed Ben Bachir	MBB	DW	Local	Late
BIDI17	BIDI17	DW	Local	Late
Chen's	CHEN's	DW	ICARDA	Early
Vitron	VITRON	DW	SPAIN	Early
G1-F14 line 1	G1	Line from P3-P4	ENSA Algiers	Early
G4-F14 line 4	G4	Line from P1-P2	ENSA Algiers	Early
G9-P1 line G4	G9 P1-G4	DW	FRANCE	Early at very early
G10-P2 line G4	G10 P1-G4	DW	FRANCE	Semi-early

SW Soft wheat, *DW* Durum wheat

However, in 2013 the fungal ergosterol analysis indicated a slight contamination for VITRON, and HD1220.

Comparison of symptom severity and ergosterol content in grain

The four strains of *F. culmorum* were pathogenic towards all the varieties but the aggressiveness varied greatly among the isolates in the severity of the visual disease symptoms induced (See Tables 3 and 4, Disease Index (DI)). A test of Tukey performed (on the whole results) (HSD) showed that the strains differed significantly ($p < 0.0001$) in their ability to cause head blight. The multiple comparison of means (CMM) for (DI) using the Newman - Keuls test at 5 % shows that BD11 and BT11 strains producing DON/3-ADON are the most aggressive, while the T5 06 and T7 06 isolates producing NIV/FX are the less aggressive.

For the four strains, the DI vary from 27.67 for ARZ; (T5 06, 2012) to 87 % for VITRON (BD11, 2013) (See Tables 3 and 4), but they present similar general pattern for the DI based classification of varieties. The maximum index of severity was measured for susceptible DW varieties VITRON and CHEN's in the 2 years but the 2013 DI was superior to the 2012 DI. The test of Newman-Keuls showed that the VITRON and CHEN's were the most susceptible and ARZ was the most resistant and durum wheat seems less resistant than soft wheat.

Visual evaluation of symptoms is prone to errors and is not always fully representative of the fungal invasion.

Actually, for equivalent values of symptoms annotation, there were large differences observed among scabby grains once harvested. Measuring the ergosterol in harvested grains allows a more relevant evaluation of fungal development inside the grain (Seitz et al. 1977). We have performed such an analysis on all the samples and the result is reported as Ergosterol Index (EI) in Tables 3 and 4. Result of Newman-Keuls for EI shows that the homogeneous group with the highest EI represents BD11 strain, followed by a group represented by BT11 and then a which represent both T5 06 and T7 06 and shows the lower DI. For all varieties, the ergosterol level turned being higher in 2013 compared to 2012. This probably reflects differences in climatic condition between the 2 years. For classification of varieties, the Newman-Keuls test showed that the variety CHEN's is the one presenting the highest EI, followed by VITRON, while ARZ, BIDI 17 and FLORENCE exhibited the lower EI. Higher concentration of ergosterol were found in the introduced durum wheat varieties VITRON and CHEN's, which were also the two that had the highest susceptibility to FHB as judged with the DI. In our experiment, they behave as the most sensitive varieties when assayed in Algerian conditions. The results also clearly show that in general, soft wheat is more resistant than durum wheat in terms of mycelium development. The autochthon SW ARZ variety is the one exhibiting the best tolerance to fungal spreading among the four strains used. The two autochthon late durum wheat varieties

Table 3 Resistance of eight wheat varieties to *F. culmorum* DON/ADON isolates causing Fusarium head blight

Fusarium strain	BT11						BD11					
	Name	Year	Species	Index	DI % ± SD	EI µg/g ± SD	DON µg/g ± SD	DI % ± SD	EI µg/g ± SD	DON µg/g ± SD		
ARZ	2012	SW	R	R	27.94 (±1.87)	41.19 (±1.13)	22.57 (±1.81)	28.96 (±1.98)	43.65 (±5.40)	28.65 (±3.16)		
	2012	DW	R/S	R/S	40.67 (±1.15)	28.18 (±2.55)	10.75 (±0.29)	57.17 (±2.57)	64.25 (±4.35)	30.47 (±4.07)		
MBB	2012	DW	R/S	R/S	50.07 (±0.90)	31.73 (±2.89)	26.66 (±1.41)	57.00 (±2.65)	68.75 (±6.54)	31.95 (±1.88)		
	2012	SW	R/S	R/S	50.22 (±2.01)	37.48 (±2.88)	21.38 (±2.27)	57.00 (±3.00)	69.64 (±2.10)	41.26 (±2.95)		
HD1220	2012	SW	S	S	61.87 (±2.27)	53.72 (±3.05)	29.22 (±4.51)	60.81 (±2.55)	86.83 (±2.75)	62.43 (±5.46)		
	2012	SW	S	S	72.40 (±5.79)	84.74 (±8.89)	71.34 (±4.21)	69.67 (±4.51)	79.56 (±11.06)	83.06 (±1.36)		
VITRON	2012	DW	S	S	77.80 (±2.55)	80.49 (±5.27)	87.05 (±7.29)	74.78 (±4.67)	144.98 (±5.04)	142.99 (±14.53)		
	2012	DW	S	S	69.10 (±0.85)	102.48 (±3.52)	33.51 (±2.76)	72.77 (±2.54)	152.37 (±6.13)	52.33 (±2.65)		
ARZ	2013	SW	R	R	40.27 (±2.91)	62.01 (±8.84)	20.50 (±0.86)	43.95 (±3.35)	63.50 (±8.84)	23.00 (±2.52)		
	2013	DW	R/S	R/S	45.29 (±4.67)	69.35 (±3.07)	25.08 (±2.80)	55.13 (±4.85)	123.47 (±3.07)	40.36 (±3.26)		
BIDI 17	2013	DW	R/S	R/S	47.87 (±2.32)	52.37 (±1.96)	30.20 (±3.72)	50.87 (±3.87)	93.81 (±1.96)	35.60 (±1.06)		
	2013	SW	R/S	R/S	48.10 (±2.52)	59.63 (±7.85)	31.21 (±4.69)	46.77 (±3.40)	83.38 (±7.85)	36.80 (±2.91)		
MAHON	2013	SW	S	S	60.27 (±4.91)	84.71 (±12.91)	37.74 (±2.28)	66.61 (±3.23)	112.26 (±12.91)	56.75 (±5.76)		
	2013	SW	S	S	71.17 (±3.40)	89.95 (±8.99)	50.11 (±6.79)	70.73 (±3.99)	150.74 (±8.99)	78.12 (±15.21)		
VITRON	2013	DW	S	S	79.77 (±0.87)	87.70 (±6.51)	72.00 (±1.50)	86.97 (±7.51)	153.25 (±6.51)	84.95 (±8.13)		
	2013	DW	S	S	83.34 (±6.13)	161.92 (±24.52)	29.64 (±3.46)	70.32 (±4.75)	233.90 (±24.52)	44.95 (±3.08)		

Varieties are arbitrarily ordered following the disease index observed with BT11 except for CHEN 's in 2012 which has been manually classed at the last position on the basis of EI
SW soft wheat, *DW* durum wheat, Index is the indexation in Algerian catalogue: *R* resistant, *R/S* = moderately resistant *S* sensible, *DI* Disease Index, *EI* Ergosterol Index (µg/g), *DON* deoxynivalenol +3 acetyldeoxynivalenol

Table 4 Resistance of eight wheat varieties to *F. culmorum* NIV/Fx isolates causing Fusarium head blight

Fusarium strain Name	Year	Species	Index	T5 06			T7 06		
				DI % ± SD	EI µg/g ± SD	NIV µg/g	DI % ± SD	EI µg/g ± SD	NIV µg/g ± SD
ARZ	2012	SW	R	27.67 (±2.52)	23.68 (±1.32)	6.90 (±1.41)	30.99 (±1.16)	28.00 (±2.84)	8.32 (±0.77)
BIDI 17	2012	DW	R/S	37.09 (±1.72)	24.72 (±1.25)	5.09 (±0.26)	36.57 (±1.36)	21.96 (±1.96)	8.34 (±1.88)
MBB	2012	DW	R/S	40.43 (±0.59)	31.92 (±1.64)	7.41 (±1.71)	42.00 (±2.65)	47.75 (±2.33)	5.80 (±0.72)
FLORENCE	2012	SW	R/S	36.43 (±2.23)	28.17 (±1.95)	5.21 (±0.53)	40.51 (±2.48)	28.86 (±1.17)	7.52 (±0.94)
HD1220	2012	SW	S	42.77 (±2.04)	27.97 (±2.08)	7.12 (±1.33)	55.53 (±0.85)	41.33 (±3.71)	13.04 (±1.21)
MAHON	2012	SW	S	45.43 (±0.75)	30.53 (±0.65)	9.28 (±0.83)	64.67 (±1.53)	59.83 (±1.58)	16.48 (±2.66)
VITRON	2012	DW	S	61.70 (±2.86)	75.60 (±4.50)	15.88 (±1.91)	71.33 (±3.21)	85.37 (±5.06)	29.70 (±4.03)
CHEN's	2012	DW	S	62.44 (±3.60)	77.60 (±2.45)	10.58 (±2.57)	78.74 (±1.56)	111.97 (±2.14)	29.02 (±2.16)
ARZ	2013	SW	R	34.50 (±1.90)	33.62 (±2.40)	8.85 (±0.07)	36.48 (±3.08)	38.35 (±3.02)	10.94 (±0.87)
MBB	2013	DW	R/S	45.03 (±4.95)	39.00 (±2.14)	10.32 (±0.41)	49.20 (±0.92)	72.60 (±6.17)	12.96 (±0.91)
BIDI 17	2013	DW	R/S	41.22 (±3.39)	34.18 (±1.12)	9.10 (±1.43)	46.20 (±1.99)	32.96 (±5.45)	8.99 (±0.36)
FLORENCE	2013	SW	R/S	43.71 (±1.64)	41.51 (±1.79)	9.22 (±0.26)	46.17 (±4.40)	38.24 (±5.81)	10.53 (±0.56)
MAHON	2013	SW	S	49.66 (±0.78)	35.42 (±0.74)	14.68 (±0.25)	60.17 (±5.20)	72.06 (±6.83)	17.70 (±0.33)
HD1220	2013	SW	S	59.85 (±2.29)	48.67 (±2.90)	13.92 (±0.41)	58.03 (±2.30)	54.94 (±6.00)	17.43 (±1.49)
VITRON	2013	DW	S	76.25 (±3.81)	113.62 (±4.55)	43.10 (±3.07)	75.15 (±4.83)	121.55 (±12.13)	42.11 (±3.96)
CHEN's	2013	DW	S	71.42 (±3.60)	114.80 (±5.27)	24.97 (±2.57)	76.67 (±2.89)	178.23 (±16.41)	34.05 (±2.52)

Varieties are arbitrarily ordered following the disease index observed with BT11 except for CHEN 's in 2013 which has been manually classed at the last position on the basis of EI

SW soft wheat, DW durum wheat, Index is the indexation in Algerian catalogue: R resistant, R/S = moderately resistant S sensible, DI Disease Index, EI Ergosterol Index (µg/g), NIV nivalenol + Fx

BIDI17 and MBB also appeared less susceptible compared to the other DW varieties and even when compared to most SW varieties.

Even if the DI and levels of ergosterol are sensibly different between the 2 years 2012 and 2013, the ranking remains roughly identical for these two criteria. Only CHEN's behaved quite differently for the 2 years, showing the highest EI each year, but with a DI sensibly lowest in 2012 with BT11 strain. Otherwise, it is also remarkable that the order remains more or less the same whatever the *F. culmorum* strain used. It appears also that globally, the introduced varieties MAHON DEMIA, VITRON and CHEN's are more susceptible to FHB than the endogenous varieties ARZ, MBB and BIDI17.

Trichothecenes accumulation in grains

In order to have a complete view of the FHB incidence, we also analysed the toxin accumulated inside the grains. Type B trichothecenes, either DON or NIV depending of the strain, were observed in all samples.

However, quite different levels were observed, depending of the strain used, the variety considered and the year. No FX was detected for assays with NIV chemotypes. The acetylated form of DON, 3-ADON, was not observed in most of the samples inoculated with the DON/3-ADON strains and when present, it was detected at very low level. In Table 3, DON values represent the sum of DON +3-ADON. The two *F. culmorum* BT11 and BD11 strains produced high amounts of zearalenone in the in vitro assay but the presence of ZEA was erratic and limited to only a few 2013 wheat samples. In addition, the level observed was rather low in these field assays. For this reason, the result of ZEA quantification has not been considered in this field study.

Overall, in terms of accumulation of trichothecenes in grains, the 2 years of experimentation can be considered as two very favourable years. Even if the 2 years showed differences for DI or EI contents, the differences for toxin accumulation in the varieties were quite similar for the 2 years and the accumulation of toxin generally reflected the DI or EI. However, quite strong differences

were found for the mean performance of isolates with different toxin-producing capacities. The two DON/3-ADON isolates produce significantly higher levels of toxin (from about 21 $\mu\text{g/g}$ to about 115 $\mu\text{g/g}$) than the two NIV/FX isolates (from about 2 $\mu\text{g/g}$ to 42 $\mu\text{g/g}$ of toxins). The Newman-Keuls test classify VITRON as the variety accumulating more TCTB, followed by the HD1220, CHEN's and MAHON DEMIAS varieties, and lastly, ARZ that accumulated the lowest concentration in TCTB.

Classification of varieties based on the toxin content is conserved compared to the classification with DI and EI except for the durum wheat CHEN's. Strikingly, CHEN is the more susceptible variety in term of *Fusarium* contamination as measured by ergosterol level, but it accumulates significantly (p 0.004) much less toxin than the DW VITRON. CHEN's shows the highest EI (233.9 $\mu\text{g/g}$) with BT11 in 2013 and the DON content is only about 40 $\mu\text{g/g}$, i.e. more than 2 times less than the other susceptible variety VITRON, which shows a DON and EI value of about 80 $\mu\text{g/g}$ and 153.35 $\mu\text{g/g}$ respectively. This result is confirmed regarding the results obtained with the three other *F. culmorum* strains and also for the 2 years. Regarding the ratios for DON/EI or NIV/EI, the susceptible genotype CHEN's has always significantly lower values than the resistant varieties suggesting that although CHEN's is favourable to *F. culmorum* spreading in grains, something restricts trichothecene accumulation in this variety. It has been shown that in some resistant varieties, the DON is efficiently transformed into the glucosylated form DON-Glucoside (DON-Glu) (Berthiller et al. 2005, Poppenberger et al. 2003). In order to investigate if the lower content in DON observed for the CHEN's variety could be explained by efficient transformation of DON into DON-Glu, we analysed the content in DON-Glu for ARZ, MBB, CHEN's and VITRON inoculated with the strain BD11 in the trial 2013. No higher accumulation of DON-Glu was observed for CHEN's (0.58 $\mu\text{g/g}$) compared to VITRON (0.67 $\mu\text{g/g}$) or MBB (0.5 $\mu\text{g/g}$) which could explain the lower accumulation of DON in this variety. Only ARZ (1.0 $\mu\text{g/g}$) contained about two times more DON-Glucoside than the others varieties.

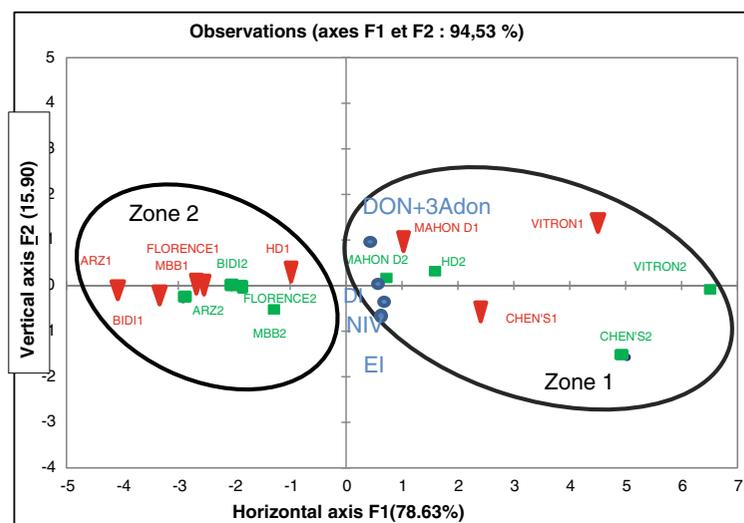
Although the 2 years conducted to slightly different DI, they give very similar results for the classification of varieties for resistance to FHB. A PCA was realized on the eight varieties for the 2 years and three variables DI, EI and TCTB content. Figure 1 shows the contribution

of the variables in the two axes F1 and F2, representing 78.63 % and 15.90 % of the total variance. This represents the better distribution of varieties for the 2 years. Zone 1 regroups all susceptible varieties and zone 2 groups the resistant ones. The coordinates on F1 show that the behaviour of varieties is similar for 2012 and 2013 except for HD1220 which grouped in zone 2 in 2012 and, because it had a higher DI and accumulated higher level of toxin, grouped in zone 1 in 2013. CHEN's is apart from the other varieties in F2 axis. This can be explained by the significantly lower level of toxin accumulated for this variety even if the DI is high as mentioned previously. Again in general, durum wheat is more susceptible than soft wheat for toxin accumulation as it was observed for DI and EI. However, BIDI 17 is as resistant to fungal development and toxin accumulation as the less susceptible soft wheat variety ARZ (Fig. 1 and Tables 3 and 4). Figure 1 also shows that the endogenous varieties ARZ for SW and BIDI 17 and MBB for DW seem less susceptible to *F. culmorum* than the introduced varieties MAHON DEMIAS for SW and VITRON and CHEN's for DW.

Evaluation of resistance of new genetic material

During the year 2013, in parallel to the eight varieties, new genetic material from ENSA El Harrach, Algiers (Mekliche, unpublished results) was assessed with the strain T5 06. Two durum wheat lines hereby called G1-F14-Line 1 and G4-F14-line 4 corresponded to F₁₄ seeds were chosen in function of the result of preliminary resistance field tests performed in 2012 (result not shown). The field assay also included the G4 parental varieties G9 (Parent 1-G4) and G10 (Parent 2 G4). For technical reason, the two others parental varieties could not be assessed in our 2013 assay. On the basis of this sole experiment, the results presented in Table 5 show that the two parental durum wheat varieties can also be considered as material susceptible to *Fusarium* infection and toxin accumulation. It can be noticed that the parent G10 behaves as CHEN's, showing a high EI and DI but a relative tolerance to toxin contamination compared to VITRON. Interestingly, the two lines G1 and G4 behaved as resistant material in term of DI and toxin production (Table 5). Particularly, G4 presented much better characteristics than ARZ, the best soft wheat tested showing the highest resistance level. In this assay, the DI (25.33) and the EI (30.21) were the lowest and

Fig. 1 Correlation of variables () and samples in the axis defined by the two components F1 and F2. (red down-pointing triangle) V arieties year1 (green square) varieties year2



the toxin content was as low as 2.04 $\mu\text{g/g}$. Actually, G4 has a NIV/EI ratio two fold lower than G1 and three to eight times lower than any of the other varieties tested in the 2013 assay.

Phenolic acid content of the grains from the varieties and lines

Monomeric forms of phenolic acids have been quantified in the mature grains of the different samples using HPLC-DAD. Results are presented in Table 6. Cinnamic derived phenolic acids were clearly the most abundant phenolics. Ferulic acid is representing up to

90 % of total monomeric phenolic content and was from far the most abundant. The second was sinapic acid followed by *p*-coumaric acid. The benzoic acid derived vanilic acid and *P*-hydroxybenzoic acid and vanillin were also detected but in lower amounts. The content in phenolic acids varies dramatically from one variety to another (from about 52 $\mu\text{g/g}$ in HD1220 to up to 1 636 $\mu\text{g/g}$ in CHEN's for ferulic acid). There is a trend toward the fact that the varieties and lines such as CHEN's, FLORENCE, G1 and G4, having the higher content in ferulic acid are the one that have the lower NIV/EI ratio; however, this is not true for all the varieties so that no clear conclusion can be drawn.

Table 5 Evaluation of the G1 and G4 durum wheat lines compared to the varieties used in Algeria

Genotype	Specie	DI% (+SD)	EI $\mu\text{g/g}$ (+SD)	NIV $\mu\text{g/g}$ (+SD)	NIV/EI ratio
G4 F14 line 4	DW	25.33 (0.31)	30.21 (2.03)	2.04 (0.30)	0.07
ARZ	SW	34.50 (1.90)	33.62 (2.40)	8.85 (0.07)	0.26
G1 F14 line 1	DW	36.67 (2.89)	63.99 (1.76)	8.78 (1.06)	0.14
BIDI 17	DW	41.22 (3.39)	34.18 (1.12)	9.10 (0.43)	0.27
FLORENCE	SW	43.71 (1.64)	41.51 (1.79)	9.22 (0.26)	0.22
MBB	DW	45.03 (4.95)	39.00 (2.14)	10.32 (0.41)	0.26
MAHON	SW	49.66 (0.78)	35.42 (0.74)	14.68 (0.25)	0.41
HD1220	SW	59.85 (2.29)	48.67 (2.90)	13.92 (0.41)	0.29
CHEN's	DW	71.42 (3.60)	114.80 (5.27)	24.97 (2.57)	0.22
G10 (Parent 1-G4)	DW	73.67 (1.53)	128.72 (1.53)	24.16 (1.90)	0.19
VITRON	DW	76.25 (3.81)	113.62 (4.55)	43.10 (3.07)	0.38
G9 (Parent 2-G4)	DW	78.33 (2.89)	144.89 (5.24)	34.11 (4.36)	0.24

Assays were performed in 2013 with the *F. culmorum* isolate T5 06. Classification of varieties is based on the DI

Table 6 Content in cinnamic derived phenolic acids measured in grains of the different varieties

Variety or line	Specie	Phenolic acid content in mature grains in 2013 ($\mu\text{g/g}$)					
		Ferulic \pm SD	Sinapic \pm SD	<i>p</i> -coumaric \pm SD	Vanillic \pm SD	Vanillin \pm SD	4-hydroxy- benzoic \pm SD
CHEN's	DW	1636 (\pm 26.5)	216 (\pm 6.4)	28(\pm 2.9)	13 (\pm 1.5)	16 (\pm 2.9)	3 (\pm 0.1)
FLORENCE	SW	1438 (\pm 5.7)	151 (\pm 28.8)	57 (\pm 4.2)	nd	1(\pm 0.1)	nd
G1	DW	1126 (\pm 7.1)	150 (\pm 5.6)	42 (\pm 1.6)	nd	nd	nd
BIDI17	DW	1035 (\pm 28.4)	93 (\pm 1.5)	32 (\pm 1.5)	18 (\pm 1.5)	28 (\pm 4.3)	6 (\pm 0.1)
G4	DW	988 (\pm 11.3)	133 (\pm 8.4)	54(\pm 2.8)	nd	nd	nd
MAHON	SW	780 (\pm 1.1)	110 (\pm 1.4)	11 (\pm 0.3)	nd0	32 (\pm 2.8)	12 (\pm 1.1)
MBB	DW	763 (\pm 17.1)	158 (\pm 17.0)	32 (\pm 1.4)	12 (\pm 0.14)	8 (\pm 0.1)	19 (\pm 1.6)
G10 Parent1 G4	DW	730 (\pm 12.7)	76 (\pm 3.0)	22 (\pm 2.8)	nd	nd	nd
ARZ	SW	730 (\pm 15.5)	67 (\pm 4.2)	50 (\pm 1.4)	nd	nd	nd
G9 Parent2 G4	DW	555 (\pm 14.3)	107 (\pm 6.9)	46 (\pm 4.2)	nd	nd	nd
VITRON	DW	483 (\pm 14.1)	69 (\pm 2.8)	3 (\pm 0.6)	20 (\pm 1.4)	16 (\pm 1.5)	13 (\pm 1.4)
HD1220	SW	52 (\pm 0.1)	46 (\pm 1.5)	2 (\pm 0.1)	11 (\pm 0.1)	16 (\pm 4.3)	12 (\pm 1.5)

nd not detected

Discussion

Because of its rapidly increasing population, Algerian consumption of wheat (both durum wheat and common wheat) is largely superior to its actual capacity of production. Due to the semi-arid climate, areas of culture cannot be sufficiently extended to increase the production. Consequently, the internal market has been depending on huge level of importation in the recent years. In addition, yields are quite low for the wheat grown locally and should be improved. Various reasons are responsible of this situation including historical ones, but the semi-arid and arid climatic area where it is cultivated lead generally to the use of locally adapted indigenous durum wheat varieties with poor yield. Search for new varieties adapted to the climatic areas and showing acceptable yields is a necessity for this country. However, adaptation of abroad varieties and breeding for new material must also take into account the potential risk of *Fusarium* and its mycotoxins as Fusarium Root Rot (FFR) and Fusarium Head Blight (FHB) were reported in Algeria (Bouregghda 2009). Such diseases can result in important losses in yields and quality of cereals (Holloway et al. 2013). Then *Fusarium* epidemic is a threat as it could greatly impair the progress provided by improvement of varieties by breeders for local adaptation to climatic condition if no care to select also for varieties resistant to *Fusarium* is taken. Up to now, very little is known in Algeria about

the endemic *Fusarium* species, their capacity to cause Fusarium head blight and mycotoxin contamination and the tolerance of the varieties used to these local species in arid and semi-arid condition.

In this work we characterized four isolates of *Fusarium* for their capacity to produce high level of mycotoxins and to infect wheat spikes. These strains were isolated from wheat spikes of durum wheat collected in Oued Smar and Rouiba located close to Algiers. The four *Fusarium* isolates were visually identified as *F. culmorum* and the species confirmed by molecular analysis. The result of a survey in Algeria in the years 2008–2010 showed that *F. culmorum* is the predominant species observed in Algeria on wheat (unpublished results), although *F. pseudograminearum* was also quite frequently observed and a few *F. graminearum* isolates were detected too. Presence of the two species *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* are typically predominantly observed in the southern hemisphere (Obanor and Chakraborty 2014) and also reported as dominant species in many Mediterranean countries such as Tunisia, (Kammoun et al. 2010, 2009), Syria and Egypt (Alkadri et al. 2013; Balmas et al. 2015), as well as in Italy (Rossi et al. 1995; Scherm et al. 2013; Balmas et al. 2015) including the island of Sardinia (Tyrrhenian Islands) (Balmas et al. 2015). In these countries, both FHB and FRR have been described suggesting that typical climatic conditions with arid or semi-arid area may be the driver for these species. Another remark is that in

these countries, both durum wheat and soft wheat are extensively grown, an agronomic situation that may favour these two *Fusarium* species.

The four *F. culmorum* Algerian isolates were characterized for their chemotype by molecular analyses. Two strains were typed as having the DON/3-ADON chemotype, the two other strains being of the NIV/FX chemotype. These two chemotypes are the one more generally described for *F. culmorum* worldwide with the proportion between DON/3-ADON and NIV/FX isolate varying between the years and the countries (For review see: (Pasquali and Migheli 2014)). These predicted chemotype were confirmed by analysis of the toxin produced in vitro when grown on rice grains. As generally found, the DON/3-ADON production in vitro is one order of magnitude higher than the production of NIV/FX. This difference was further confirmed in vivo with the results of field assays. In addition to the production of trichothecenes, the two DON/3-ADON isolates produced high amount of zearalenone in vitro. Production of this estrogenic toxin has been frequently reported for *F. culmorum* on different cereals (Bottalico 1998; Bakan et al. 2001). Strikingly, these strains produced no or trace amount of zearalenone when inoculated on wheat spike in field experiment. This suggests that either the wheat varieties used or the environmental conditions during the field experiments were not conducive for the biosynthesis of zearalenone.

The first question we addressed in this work concerned the capacity of Algerian *F. culmorum* strains to confer FHB on spike and to produce toxins in the grain in our local conditions. The second question was to evaluate the tolerance to FHB of the varieties used in Algeria for the production of wheat. A preliminary assay to assess the pathogenicity of our isolates of *F. culmorum* strains when inoculated on spike of different varieties showed that the strains were all pathogenic as they conferred FHB symptoms. Then, the four isolates were used as reference strains in a 2 year field experiment for inoculation on eight varieties, including local and foreign ones, of both soft and durum wheat. The toxigenic potential and the aggressiveness of the four strains of *F. culmorum*, of both DON/3-ADON and NIV/FX chemotypes, used for the artificial inoculation has been one component of the success of our experiments. These resulted in 2012 and 2013 in consequent fungal growth and symptoms associated with a significant production of toxins. The results obtained allow us to draw several clear elements of conclusion. First,

based on DI and EI, higher levels of severity were found for the two DON/3-ADON strains. The other two NIV/FX strains proved slightly less virulent in term of symptoms and of mycelium development and, depending of the variety, accumulated 5–10 times less trichothecene than the DON/3-ADON strains. This chemotype effect with a slightly slower spread of the NIV/FX strains in the ears has also been abundantly described before for *F. culmorum* (Miedaner et al. 2001; Wegulo 2012) and it was also observed for the species *F. graminearum* (Mirocha et al. 1994) and *Fusarium asiaticum* (Zhang et al. 2012; Shen et al. 2012). However, in term of symptoms, the difference of aggressiveness between the two chemotypes remains moderate in our experiments when compared to the reports in the literature, suggesting our two Algerian NIV strains are quite aggressive.

The data for the 2 years 2012–2013 strongly support a tight correlation between the level of trichothecene production and the symptoms observed when each of the two chemotype is considered apart. This correlation is even stronger between the quantity of toxin and the development of the fungus in the grain as measured by the ergosterol index. This was described first by Miller et al. (Miller et al. 1985) a long time ago and has been since reported by various authors (Mirocha et al. 1994; Perkowski et al. 1996; Miedaner et al. 2000). Higher the DI is, more important the fungal development is, and higher is the quantity of toxin accumulated in the grains (For review see: (Foroud and Eudes 2009)). This seems to be the rule in our samples and the variability in development and toxin production is clearly due to a variety effect. However, this rule does not apply for the CHEN's variety. This durum wheat variety exhibits a high susceptibility with a DI comparable to VITRON and a development of the fungus similar or even greater than VITRON or some of the other susceptible varieties but strikingly, with the four fungal strains, the accumulation of trichothecenes is significantly lower for this variety. A resistance to the accumulation of trichothecene has already been and discussed before (Boutigny et al. 2008). Two main reasons can explain such a result: i) the toxin is produced but modified by a detoxification process; and ii) the accumulation of the toxin remains limited due to a grain composition unfavourable for the biosynthesis (Boutigny et al. 2008). It has been shown that in some resistant varieties, the DON is efficiently transformed by the plant into the glucosylated form DON-Glucoside (DON-Glu) (Berthiller et al. 2005;

Poppenberger et al. 2003). However, in our case, the lower content in DON observed for the CHEN's variety in 2013 could not be explained by an efficient transformation of DON into DON-Glu, as the content of DON-Glu measured for CHEN's is similar to the one of VITRON or MBB. Plant biochemical inhibitory compounds present at the moment the fungus invade the forming grain could explain a lower biosynthesis of DON (Boutigny et al. 2008; Miller and Arnison 1986). It has been shown that, for example, phenolic acids can strongly modulate trichothecenes biosynthesis by *F. graminearum* (Ponts et al. 2011). As phenolic acid profiles vary between wheat varieties (Lempereur et al. 1997; Moore et al. 2006; Albermann et al. 2013), they could be good candidate compounds for the reduced trichothecene biosynthesis in kernels (Boutigny et al. 2009, 2008). Several reports suggested that resistance to *Fusarium* is correlated with kernel phenolic content in maize at maturity (Reid et al. 1992; Assabgui et al. 1993; Bily et al. 2003) and wheat (McKeehen et al. 1999; Siranidou et al. 2002). A more recent work (Boutigny et al. 2009) showed that a phenolic fraction extracted from wheat bran exhibited a strong inhibitory effect on in vitro DON/3-ADON biosynthesis by *F. culmorum*. Ferulic acid is generally abundantly present in the grain of durum wheat and this suggested a possible role in resistance to trichothecene accumulation *in planta* (Boutigny et al. 2009, 2008). Our results of phenolic acids analyses in 2013 show that ferulic acid is by far the most abundant phenolic acid (90 % of total monomeric phenolic content), in accordance with pre-

viously published studies (Onyeneho and Hettiarachchy 1992; Kim et al. 2006). It is noteworthy that the CHEN's variety has the highest content in cinnamic derived phenolic acids, especially in ferulic acid and sinapic acids. This seems coherent with the known inhibitory effect of cinnamic derived phenolic acids (Ponts et al. 2011) and the limited accumulation of trichothecenes in this variety. This observation is true also for the lines G1 and G4, but for the two other varieties Florence and BIDI 17 which also present a high content in ferulic acid, no such clear effect of lower toxin accumulation was observed. However, it is noteworthy that the content in phenolic acid has been determined in the mature grain. Accumulation of phenolic compounds varies greatly during the filling of the grain and the level is generally the highest in the early stage of grain filling as shown in maize (Atanasova-Pénichon et al. 2012). If a significant effect on modulation of trichothecenes accumulation is expected, it would mainly depend of the content in phenolic acids at the moment the fungus invades the grain during the days just following the inoculation. It should be suitable to investigate the timing of accumulation of the phenolic compounds in the varieties that accumulate less trichothecene.

Our results provide a first evaluation of the wheat varieties used in Algeria for the tolerance to FHB caused by local *Fusarium* strains of *F. culmorum*. The following classification from the less susceptible to the most susceptible can be drawn from all our results for Algerian climatic conditions:

ARZ_(SW) + BIDI_(DW) + MBB_(DW) >> FLORENCE_(SW) > HD1220_(SW) > MAHON DEMIAS_(SW) > VITRON_(DW) > CHEN's_(SW)

First, these results show that globally, durum wheat is more susceptible to *F. culmorum* than soft wheat. This is in agreement with the generally admitted tendency that durum wheat is more susceptible than common wheat to FHB caused by species such as *F. graminearum* or *F. culmorum* (Buerstmayr et al. 2009; Lionetti et al. 2015). The classification established after these field assays showed that the two DW BIDI17 and MBB behaved as the less susceptible material meanwhile the introduced varieties VITRON and CHEN's were very susceptible. A general conclusion that can be drawn from this study is that before a variety of wheat is going to be introduced and grown to large extend in a specific

climatic area, it should be judicious to correctly assess its resistance to FHB in this climatic condition. Another remark is related to the fact that the DW variety BIDI17 and MBB are autochthonous. This may suggests that they are best adapted either to the semi-arid climatic conditions or to the local fungal strains we used. However, it must be taken into account that generally, no significant resistance has ever been observed for durum wheat (Buerstmayr et al. 2009). Then, the lower susceptibility of some varieties we observed in our assay may be uncertain. This need also to be modulated by the fact the soft wheat varieties used in our assay are the one grown in Algeria. These varieties are not known as

being the best resistant varieties to FHB available worldwide to date. It should be worthwhile to introduce reference resistant material in such field assays to have a good reference for a better classification of resistance.

One of the different reasons for initiating this work was to characterise genetic material adapted to the Algerian geographic conditions and showing acceptable tolerance to FHB. Among the traditionally cultivated local varieties, ARZ for soft wheat and BIDI 17 or MBB for durum wheat seem the best ones. However, the two new DW lines developed recently at ENSA EL Harrach and tested in 2013 showed interesting properties. The line G1 is issued from a cross between an introduced variety and a local variety. These two lines showed low disease index and ergosterol index when inoculated with the NIV producing strain T 5 06. In addition they showed a low level of nivalenol accumulation and had by far the lowest NIV/EI ratio. These two lines have been retained among various line issues for their correct behaviour when grown in Algerian climatic conditions. However, these results are preliminary as these new lines have been tested for resistance only once and with only one strain of *F. culmorum*. In addition, the test has been performed using spray inoculation which mainly evaluates type I resistance to FHB that operates against initial infection but does not really evaluate the progression of the fungus within the host (type II resistance) (Schroeder and Christensen 1963; Boutigny et al. 2008). These lines must be tested in various location and with different strains of *Fusarium* and different methods of inoculation to correctly assess their tolerance to FHB, but this result is very encouraging and shows that it would be possible to select for durum wheat material adapted to arid or semi-arid climatic conditions that exhibit an improved tolerance to FHB.

Acknowledgments Sihem Touati Hattab thanks the Teldji University of Laghouat for financial support. She also thanks the «Comité Mixte d'Evaluation et de Prospective de la coopération scientifique franco-algérienne» CMEP PHC TASSILI for support through the « Agence Française pour la promotion et l'enseignement supérieur, l'accueil et la mobilité internationale » during the different stays at MycSA laboratory, INRA Bordeaux Aquitaine, France.

References

- Akinsanmi, O., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., & Chakraborty, S. (2006). Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathology*, 55, 494–504.
- Albermann, S., Linnemannstöns, P., & Tudzynski, B. (2013). Strategies for strain improvement in *Fusarium fujikuroi*: overexpression and localization of key enzymes of the isoprenoid pathway and their impact on gibberellin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 2979–2995.
- Alkadri, D., Nipoti, P., Doll, K., Karlovski, P., Prodi, A., & Pisi, A. (2013). Study of fungal colonization of wheat kernels in Syria with a focus on fusarium species. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 5938–5951.
- Assabgui, R. A., Reid, L. M., Hamilton, R. I., & Arnason, J. T. (1993). Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 83, 949–953.
- Atanasova-Pénichon, V., Pons, S., Pinson-Gadais, L., Picot, A., Marchegay, G., Bonnin-Verdal, M. N., Ducos, C., Barreau, C., Roucolle, J., Sehabiague, P., Carolo, P., & Richard-Forget, F. (2012). Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1605–1616.
- Atanasova-Pénichon, V., Bernillon, S., Marchegay, G., Lornac, A., Pinson-Gadais, L., Pons, N., Zehraoui, E., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2014). Bioguided isolation, characterization, and biotransformation by *Fusarium verticillioides* of maize kernel compounds that inhibit fumonisin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 1148–1158.
- Bakan, B., Pinson, L., Cahanier, B., Melcion, D., Sémon, E., & Richard-Molard, D. (2001). Toxicogenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives & Contaminants*, 18, 998–1003.
- Balmas, V., Scherm, B., Marcello, A., Beyer, M., Hoffmann, L., Migheli, Q., & Pasquali, M. (2015). *Fusarium* species and chemotypes associated with fusarium head blight and fusarium root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathology*, 972–979.
- Balzer, A., Tardieu, D., & Bailly, J. D. (2004). Les trichothécènes: nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *Revisa de Medicina Veterinaria*, 155, 299–314.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497–516.
- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., & Krska, R. (2005). Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3421–3425.
- Bianchini, A., Horsley, R., Jack, M. M., Kobielush, B., Ryu, D., Tittlemier, S., Wilson, W. W., Abbas, H. K., Abel, S., Harrison, G., Miller, J. D., Shier, W. T., & Weaver, G. (2015). DON occurrence in grains: a north American perspective. *Cereal Foods World*, 60, 32–56.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A. J., Bakan, B., Regnault-Roger, C., PAULS, K. P., Arnason, J. T., & Philogene, B. J. R. (2003). Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93, 712–719.

- Bottalico, A. (1998). Fusarium disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85–103.
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611–624.
- Boutigny, A., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2008). Natural mechanisms for plant resistance to Fusarium mycotoxins accumulation. *Journal of European Plant Pathology*, 121, 411–423.
- Boutigny, A. L., Barreau, C., Atanasova-Pénichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L., & Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in Fusarium liquid cultures. *Mycological Research*, 113, 746–753.
- Boutigny, A.-L., Atanasova-Pénichon, V., Benet, M., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 275–286.
- Buerstmayr, H., Ban, T., & Anderson, J. A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128, 1–26.
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxines chemistry, genetics, and biology*. Minnesota U.S.A: St. Paul.
- Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S., & Collin, J. (2001). Impact of trichothecenes on Fusarium head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 318–322.
- Foroud, N. A., & Eudes, F. (2009). Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 147–173.
- Hazel, C. M., & Patel, S. (2004). Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters*, 153, 51–59.
- Hestbjerg, H., Felding, G., & Elmholt, S. (2002). *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology*, 150, 308–312.
- Hollaway, G. J., Evans, M. L., Wallwork, H., Dyson, C. B., & McKay, A. C. (2013). Yield loss in cereals, caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, is related to fungal DNA in soil prior to planting, rainfall, and cereal type. *Plant Disease*, 97, 977–982.
- Kammoun, L. G., Gargouri, S., Hajlaoui, M. R., & Marrakchi, M. (2009). Occurrence and distribution of microdochium and Fusarium species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *Journal of Phytopathology*, 157, 546–551.
- Kammoun, L. G., Gargouri, S., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Hajlaoui, M. R. (2010). Trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* infecting wheat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 84–89.
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95, 466–473.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., & Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2105–2123.
- Klaassen, J. A., Matthee, F. N., Marasas, W. F. O., & Van Schalkwyk, D. J. (1991). Comparative isolation of Fusarium species from plant debris in soil and wheat stubble and crowns at different locations in the southern and Western Cape. *Phytophylactica*, 23, 299–307.
- Lempereur, I., Rouau, X., & Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25, 103–110.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*.
- Lionetti, V., Giancaspro, A., Fabri, E., Giove, S. L., Reem, N., Zabolina, O. A., Blanco, A., Gadaleta, A., & Bellincampi, D. (2015). Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biology*, 15, 6 Open Access.
- Maier, F. J., Miedaner, T., Hader, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H., & Schäffer, W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7, 449–461.
- Marin, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2005). Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329–341.
- McKeehen, J., Busch, R., & Fulcher, R. (1999). Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to Fusarium resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1476–1482.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., & Schilling, A. (2000). Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107, 124–134.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Lauber, U., Schollenberger, M., & Geiger, H. H. (2001). Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to Fusarium head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding*, 120, 97–105.
- Miller, J. D., & Arnison, P. G. (1986). Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the Fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8, 147–150.
- Miller, J. D., Young, J. C., & Sampson, D. R. (1985). Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology*, 113, 359–367.
- Mirocha, C. J., Xie, W., Xu, Y., Wilcoxson, R. D., Woodward, R. P., Etebarian, R. H., & Behele, G. (1994). Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* on barley and wheat. *Mycopathologia*, 128, 19–23.
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M. N., Bormann, J., Pons, N., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2013). The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 8(12), e83377.

- Moore, J., Liu, J. G., Zhou, K. Q., & Yu, L. L. (2006). Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 5313–5322.
- Niessen, M. L., & Vogel, R. F. (1998). Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Systematic and Applied Microbiology*, *21*, 618–631.
- Obanor, F., & Chakraborty, S. (2014). Aetiology and toxigenicity of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* causing crown rot and head blight in Australia under natural and artificial infection. *Plant Pathology*, *63*, 1218–1229.
- Onyeneho, S. N., & Hettiarachchy, N. S. (1992). Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 1496–1500.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., & Mcleod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, *44*, 207–238.
- Pasquali, M., & Migheli, Q. (2014). Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 164–182.
- Perkowski, J., Kiecana, I., Schumacher, U., Müller, H.-M., Chelkowski, J., & Goliński, P. (1996). Head blight and biosynthesis of *Fusarium* toxins in barley kernels field inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, *102*, 491–496.
- Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Chaurand, M., Gregoire, S., Monmarson, M., & Richard-Forget, F. (2007). Distribution of toxigenic *Fusarium* spp. and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. *Food Additives and Contaminants*, *24*, 53–62.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Boutigny, A. L., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2011). Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology*, *101*, 929–934.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kulcher, K., Glossl, J., Luschnig, C., & Adam, G. (2003). Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 47905–47914.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *8*, 593–601.
- Reid, L. M., Mather, D. E., Aranas, J. T., Hamilton, R. I., & Bolton, A. T. (1992). Changes in phenolic constituents of maize silk Infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, *70*, 1697–1702.
- Rocha, O., Ansari, K., & Doohan, F. M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives and Contaminants*, *22*, 369–378.
- Rossi, V., Cervi, C., Chiusa, G., & Languasco, L. (1995). Fungi associated with foot rots on winter wheat in northwest Italy. *Journal of Phytopathology*, *143*, 115–119.
- Saraf, A., Larsson, L., Burge, H., & Milton, D. (1997). Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* ameobocyte lysate assay. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 2554–2559.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., & Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, *14*, 323–341.
- Schroeder, H. W., & Christensen, J. J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, *53*, 831–838.
- Schwadorf, K., & Muller, H. (1989). Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, *72*, 457–462.
- Seitz, L. M., Mohr, H. E., Burroughs, R., & Sauer, D. B. (1977). Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, *54*, 1207–1217.
- Shen, C.-M., Hu, Y.-C., Sun, H.-Y., Li, W., Guo, J.-H., & Chen, H.-G. (2012). Geographic distribution of trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* species complex in major winter wheat production areas of China. *Plant Disease*, *96*, 1172–1178.
- Siranidou, E., Kang, Z., & Buchenauer, H. (2002). Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology*, *150*, 200–208.
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, *175*, 149–163.
- Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, *4*, 1157–1180.
- Xu, X. M., & Berrie, A. M. (2005). Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: a review. *Food Additives and Contaminants*, *22*, 290–301.
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Zhang, Y., & Feng, J. (2012). Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PloS One*, *7*(2), e31722.

PHENOTYPIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF NEW ADVANCED DURUM WHEAT BREEDING LINES FROM ALGERIA THAT SHOW RESISTANCE TO *FUSARIUM* HEAD BLIGHT AND TO MYCOTOXIN ACCUMULATION

S. Hadjout¹, S. Chéreau², V. Atanasova-Pénichon², G. Marchegay², L. Mekliche¹, H. Boureghda¹, C. Barreau², S. Touati-Hattab¹, Z. Bouznad¹ and F. Richard-Forget²

¹Laboratory of Phytopathology and Molecular Biology, National School of Agronomy, ENSA, Algiers, Algeria

²Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UR1264, MycSA, 71 Avenue Edouard Bourlaux, CS20032, 33 883 Villenave d'Ornon, France

ABSTRACT

Durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) is a crop highly susceptible to *Fusarium* head blight (FHB), which results in yield losses and downgrades the quality of grains mostly due to mycotoxin contamination. Although breeding for resistance to FHB is one of the most promising strategy for minimizing crop damage, the attempts to obtain durum wheat resistant lines have been limited so far. Two potentially interesting lines were recently delivered by a breeding program based on crosses involving cultivars from Europe and Syria. Using a field experiment in Algeria with four different *Fusarium culmorum* strains and a spray inoculation method, we demonstrated that the two breeding lines were significantly less affected than a set of commercial cultivars. The two breeding lines were shown to exhibit a higher resistance to both initial fungal infection and disease spread, and to mycotoxin contamination. In addition, a detailed analysis of phenolic acid composition of grains indicates significant differences in *p*-coumaric acid between the FHB-resistant breeding lines and the sensitive genotypes. Our results corroborate the importance of cell wall composition in preventing the diffusion of *F. culmorum* and therefore contributing to the resistance of cereals to FHB.

Keywords: Durum wheat, *Fusarium culmorum*, phenolic acid, *p*-coumaric acid, trichothecenes.

INTRODUCTION

Durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*), is one of the most widely cultivated crops in the Mediterranean basin. This area contributes to more than half of the world total production, Italy, Spain, France, Morocco, and Algeria being ranked among the top producers (Pastaria, 2015). However, as for other Mediterranean crops, durum wheat production in Algeria is exposed to severe environmental constraints such as drought, frost and heat that can significantly affect yield and grain quality. In addition, plant diseases caused by phytopathogenic fungi are fairly common and can be responsible for yield losses as well as grain quality deterioration. One of the most devastating fungal diseases that affect durum wheat is *Fusarium* head blight (FHB), that is also damaging bread wheat, barley and oat (Covarelli *et al.*, 2015). It is largely admitted that *Fusarium graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw and *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels and I. C. Hallett, are the main fungal species responsible for FHB. According to Touati-Hattab *et al.* (2016) and Laraba *et al.* (2017), *F. culmorum* is the major fungal pathogen associated with FHB in Algeria.

In addition to yield losses, *Fusarium* species and mainly *F. graminearum* and *F. culmorum* cause significant quality loss by producing type B trichothecenes (TCTB) mycotoxins that can make harvests unsuitable for human and animal consumption. TCTB mycotoxins include deoxynivalenol (DON) and its two acetylated forms, 3-acetyl-deoxynivalenol (3-ADON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15-ADON), as well as nivalenol (NIV) and its acetylated form 4-acetylnivalenol or fusarenone X (FX). Based on TCTB production, *F. graminearum* and *F. culmorum* are divided in three chemotypes: the NIV chemotype, for isolates producing NIV and FX, the DON/15-ADON chemotype for isolates producing DON and 15-ADON and the DON/3-ADON chemotype for isolates producing DON and 3-ADON (Ichinoe *et al.*, 1983). All of the *F. culmorum* strains isolated from Algerian durum wheat harvests that have been characterized so far belong to the DON/3-ADON or NIV/FX chemotypes (Touati-Hattab

et al., 2016; Laraba *et al.*, 2017). TCTB mycotoxins are heat-stable molecules that are not fully eliminated during food and feed processing (Hazel and Patel, 2004). As a result, one of the best ways to reduce contamination of food and feed is to control the biosynthesis of these mycotoxins at the field level, during plant cultivation. Host resistance, one of the primary pillars used in control strategies and plant breeding, is recognized as the most promising tool to efficiently, economically and sustainably reduce the damage caused by FHB, including contamination of kernels with TCTB. Plant resistance to FHB is a highly complex quantitative trait controlled by multiple genes, depending on environmental and genotype \times environment interactions (Bai and Shaner, 2004). In the past decade, significant progress in the understanding of the genetic bases of common wheat resistance to FHB has been achieved, leading to the identification and characterization of over one hundred Quantitative Trait Loci (QTL) (Buerstmayr *et al.*, 2009). However, limited breeding efforts have been carried out to improve FHB resistance of durum wheat, whose production accounts for only 5% of total wheat production worldwide (International Grains Council, London, UK) and is considered a minor crop. Most commercialized durum wheat cultivars are susceptible to FHB and there is still a need to characterize appropriate resistance sources that will allow the development of resistant cultivars suitable to the different production situations of durum wheat crop, including the Mediterranean ones (Prat *et al.*, 2014). Combined with genetic approaches, many recent attempts identified key biochemical traits involved in wheat resistance to FHB and a large set of metabolites potentially acting in cereals to counteract toxigenic *Fusarium* species and reduce mycotoxin accumulation have been highlighted (Atanasova-Penichon *et al.*, 2016; Gauthier *et al.*, 2016). Phenylpropanoids are among the most frequently reported for their potential involvement in plant defense against fungal pathogens (Atanasova-Penichon *et al.*, 2016). In addition to their key role as plant defense mediators and their participation to cell wall reinforcement, these compounds display antifungal properties and some of them can interfere with mycotoxin biosynthesis (Atanasova-Penichon *et al.*, 2016; Boutigny *et al.*, 2008). However, as for genetic studies, while important efforts have been devoted to bread wheat, only few studies have investigated the metabolites or chemical traits that could be potentially linked with FHB resistance of durum wheat.

The objectives of this study were to investigate the FHB resistance of two promising advanced durum wheat breeding lines from Algeria, and to compare the resistance showed by these breeding lines to that of three commercial cultivars. To this end, artificial inoculation with four strains of *F. culmorum* was performed and symptoms, fungal development and mycotoxin accumulation were compared. In addition, a comparative analysis of phenolic acid composition of kernels from the set of lines and commercialized cultivars was conducted and the relationships

between phenolic acid composition and degree of FHB resistance investigated.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials. Two inbred lines (L1 and L2) of durum wheat, resulting from a breeding program conducted at ENSA El-Harrach, Algiers and three commercial cultivars were used, i.e. Simeto from Italy, Ardente from France, and Waha from ICARDA (Syria), here referred to as C1, C2 and C3, respectively. L1 and L2 lines are composed of F14 seeds obtained in June 2011 through diallel crosses among four cultivars. As regards precocity, L1, L2, C2 and C3 were early cultivars while C1 was a mild-early one.

Fungal strains. Four single-spore isolates of *F. culmorum* (FC-T5-06, FC-T7-06, FC-10-11, FC-01-12) were used for field inoculation. Strains FC-T5-06, FC-T7-06 and FC-10-11 were isolated from durum wheat spikes collected in the regions of Oued Smar (North of Algeria) in 2005, 2007 and 2011, respectively. Strain FC-01-12 was isolated from durum wheat collar collected in 2012 in the same cultivation areas as in 2005 and 2007. Identification as *F. culmorum* isolates was made according to the morphological characteristics of their conidia and was confirmed using species-specific molecular primers (Jurado *et al.*, 2005). Regarding mycotoxins, the chemotypes of the four *F. culmorum* isolates were chemically determined using the protocol described by Bakan *et al.* (2001). FC-T5-06 and FC-T7-06 belong to the NIV/FX chemotype while FC-10-11 and FC-01-12 are of the DON/3-ADON chemotype.

Inoculum preparation and procedure of artificial inoculation. *Fusarium* strains were maintained on potato dextrose agar (PDA) plates at 25°C in the dark, for 20 days (60 plates/isolate/field test). After incubation, spores were harvested using sterile distilled water and their concentration was determined using a Malassez haemocytometer. Concentration of the spore suspension was adjusted to the desired final concentration of 5×10^4 spores ml⁻¹. Spray inoculation (200 ml m⁻²) was performed at anthesis (anthesis was assigned when anthers could be observed in 10% of the ears). Observed dates of anthesis were similar for the five genotypes tested and inoculation was therefore possible to be made on the same day. To promote favorable conditions for spore adhesion and germination, plants were sprayed with water for 20 min. before inoculation and for 10 min. after.

Experimental design. Field experiments were carried out in 2014 (with L1 and L2) and 2015 (with L1, L2, C1, C2 and C3) at the experimental farm of ENSA El Harrach (Algiers). The experimental design was a randomized complete block with three replications with 1 m spacing between the blocks. Each plot (one durum wheat genotype/

one fungal isolate) consisted of 5 lines of 1 linear meter with a 20 cm interval between each genotype. The space between plots was 50 cm. Lines of triticale were sown between the different plots to avoid cross contamination (Fig. 1). Controls consisted of plots of durum wheat inoculated with sterile water.

Visual assessment of FHB resistance. Three parameters were assessed for each genotype/fungal strain treatment: incubation period, AUDPC (Area Under the Curve of Progression Disease) and thousand grains weight. The incubation period corresponds to the number of days from inoculation to the first appearance of a blighted spikelet in the plot. Symptom rating was performed 21, 26 and 31 days after inoculation in a randomly hand-harvested sample of 25 ears per plot. The observation unit corresponds to the percentage of spikelets exhibiting shrivelling. These percentages were used to determine the AUDPC. Finally, in order to assess the impact of the disease on yield, the 25 hand-harvested ears were beaten using a harvester machine with low speed ventilation and the thousand grains weight was measured and compared with the respective control.

Extraction and quantification of type B trichothecenes in durum wheat grains. Extraction and analysis were performed using a protocol that enables considering the different TCTB molecules including DON and its 15 and 3 acetylated derivatives, NIV and FX. Wheat grains were homogenized and ground into a fine powder using a centrifugal crusher (Retsch Tissuelyser, Germany). Five g of ground grains were extracted with 20 ml of acetonitrile/water (84/16, v/v) under stirring at 50 rpm for 1 h. After centrifugation (5 min at 3000 g), 5 ml of supernatant were purified through a trichothecene P[®] column (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Three ml of the purified eluate were evaporated to dryness at 50°C under a nitrogen stream. The dried samples were suspended in 200 µl of methanol/water (1/1, v/v) and filtered through a 0.22 µm-pore-size filter (Phenomenex, USA). Quantification of TCTB was performed on a Shimadzu Prominence UHPLC chain, equipped with two pumps LC-20 AD, a degasser DGU-20A3R, an auto sampler SIL-30 AC and a diode-array detector SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, France). Separation was achieved on a Kinetex XB-C18 100Å column (150 × 4.6 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, France) maintained at 45°C. Mobile phase consisted of water acidified with ortho-phosphoric acid to reach pH 2.6 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The following gradient was used for elution: 7% B for 1 min, 7-30% B in 6 min, 30-90% B in 2 min, 90% B for 2 min, 90-7% B in 1 min, and 6 min post-run equilibration with initial conditions. The flow was kept at 0.7 ml min⁻¹ for a total run time of 18 min. The injection volume was 0.5 µl. The UV-VIS spectra were recorded from 220 to 550 nm and peak areas were measured at 230 nm. Quantification

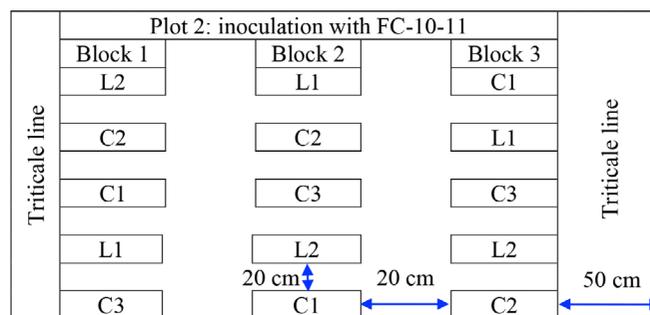


Fig. 1. Schematization of field experimental trial, example of the design for plot 2 inoculated with FC-10-11. Each genotype is 20 cm from each other and each plot (different strain) separated by Triticale line (to avoid cross contamination).

was performed using external calibration ranging from 6.25 to 100 µg ml⁻¹ prepared with standard solutions (Romer Labs, Austria).

Extraction and determination of ergosterol in durum wheat. Ergosterol analysis was performed according to the method described by Touati-Hattab *et al.* (2016). Briefly, 30 mg of finely ground wheat sample were subjected to alkaline hydrolysis (methanol, 10% KOH, 1 h, 80°C) and extracted with hexane. After evaporation of the hexane phase to dryness under a gentle stream of nitrogen, the resulting residue was dissolved in methanol before HPLC-DAD analysis.

Extraction and determination of free and bound phenolic acids in durum wheat grains. Phenolic extraction and HPLC-DAD quantification were performed using 1 g of powder of non-inoculated wheat grains harvested in 2015, following the procedure described by Touati-Hattab *et al.* (2016) with some modifications. The separation of phenolic acids was achieved on a Kinetex XB-C18 100Å column (150 × 4.6 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, France) maintained at 45°C. The mobile phase consisted of 0.20% formic acid in water (v/v) as solvent A and acetonitrile as solvent B. Phenolic acids were separated by elution gradient as follows: 5 to 15% B in 30 min, 15-50% B in 20 min, 50-90% B in 2 min, 90% B for 5 min, 90 to 5% B in 1 min, 5% B for 10 min. The injection volume was set on 5 µl and the flow rate was maintained at 1 ml min⁻¹ for a total run time of 58 min. The UV spectra were recorded from 200 to 550 nm and peak areas were measured at 260 nm, 280 nm and 320 nm according to the phenolic acid studied. Quantitation was performed by using external calibrations with standard solutions of phenolic acids prepared from commercial pure powders purchased from Sigma-Aldrich (France).

Statistical analysis of data. The statistical analysis was performed using ANOVA (Statgraphics software v 15.1.0.A). When the test was revealed to be significant, post hoc Fisher LSD test was conducted for mean separation at

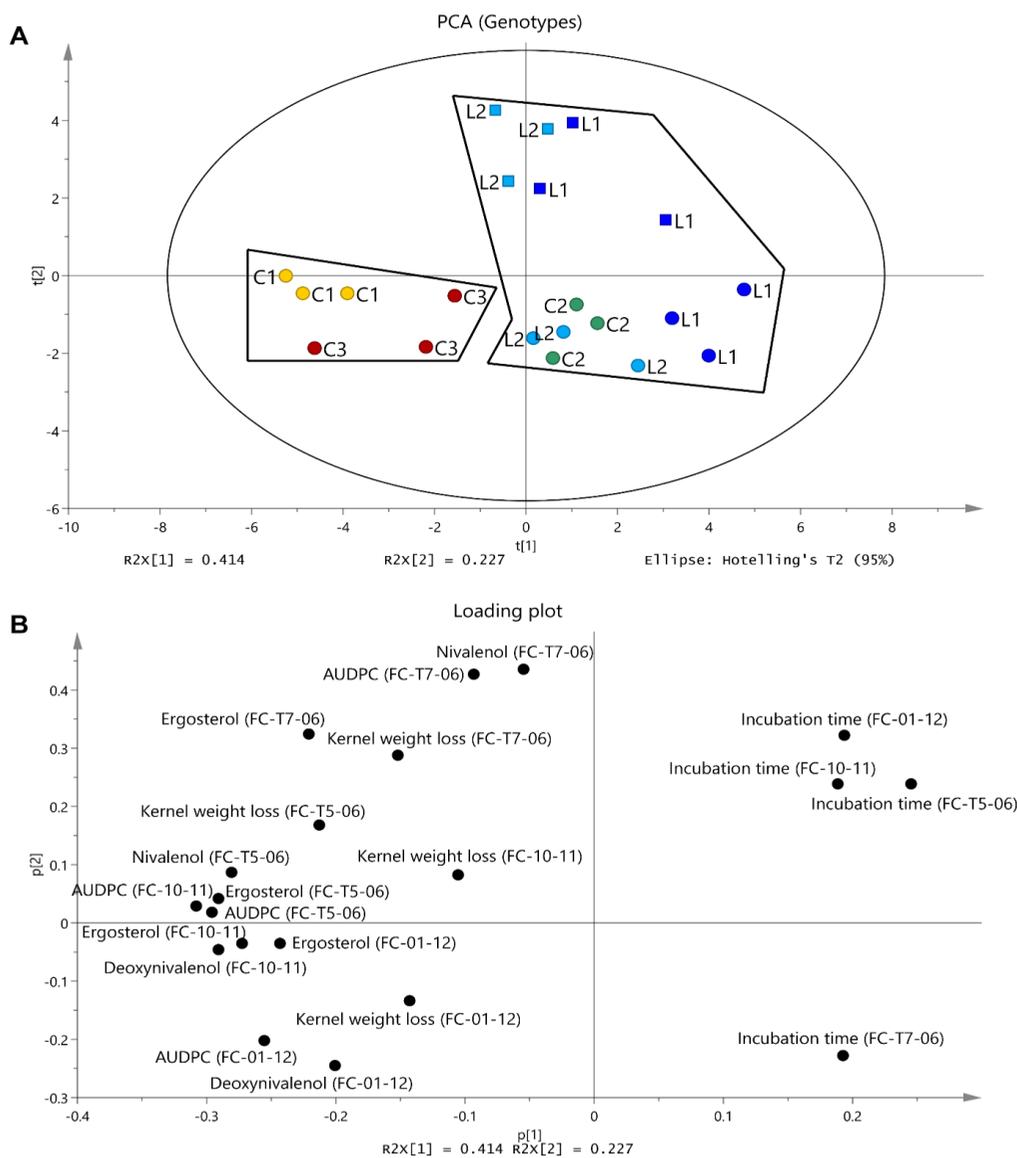


Fig. 2. Principal component analysis: (A) score plot and (B) loading plot of 20 variables in grains of 5 wheat genotypes (C1, C2, C3, L1 and L2) inoculated with different strains of *F. culmorum*. Circles represent samples from 2015 experiment and squares samples from 2014 experiment.

$p < 0.05$. For the study of correlations, Spearman tests were conducted using XLStat software v2014.6.03 (AddinSoft, France). Significance level was set at $p < 0.05$. Multivariate analyses such as Principal Component Analysis (PCA) were done using SIMCA v14 (Umetrics, Sweden).

RESULTS

Assessment of FHB resistance in durum wheat breeding lines and commercial cultivars. Measurements of AUDPC, incubation period, loss of thousand grains weight, ergosterol and TCTB content were used to compare and assess FHB resistance levels of the five durum wheat genotypes considered in the present study. These variables were determined on control and inoculated plants with the four *F. culmorum* strains, in 2014 for the

two breeding lines (L1, L2) and in 2015 for L1 and L2 and the three commercial genotypes. On control plants in 2014 and 2015, no visible FHB symptoms were observed and only trace amounts of ergosterol and TCTB were detected, below the quantification limit of the LC-methods. This result indicates the absence of natural *Fusarium* infection during field experiments and confirms the efficiency of using triticale lines as buffer zones to avoid cross contamination.

First, to have an overview of the disease related-variables associated with the different genotypes and different *F. culmorum* strains, a PCA analysis was conducted. For this analysis, each block of replication (three replications per *Fusarium* strain \times genotype) was considered as an independent treatment. The two axes PC1 and PC2 of the PCA score plots (Fig. 2A) explain 64.1% of the total variability among durum wheat samples, with PC1 accounting

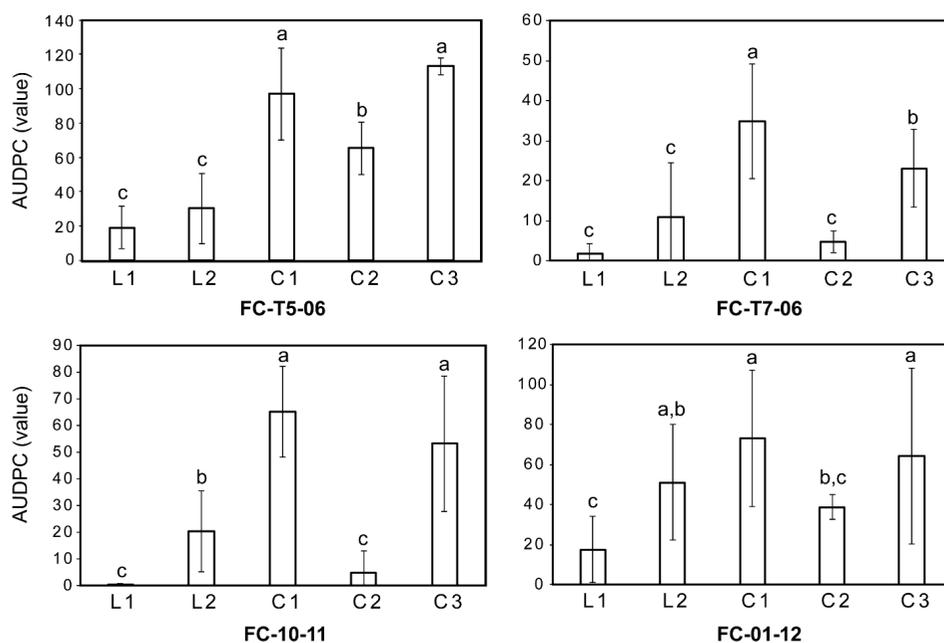


Fig. 3. Histograms of distribution of wheat genotypes for FHB severity measured by AUDPC mean values after inoculation with *F. culmorum* strains (FC-T5-06, FC-T7-06, FC-10-11 or FC-01-12) during experiment conducted in 2015. Different letters indicate significant difference between means (p -value < 0.05).

for more than 40% of the variability. The PCA score plot evidences the repeatability within groups (genotypes) regardless of the fungal strain used for wheat inoculation and indicates a clustering of the genotypes in two main groups that can be distinguished according to PC1. One group (C1 and C3) on the left of the PC1 axis separates from a second group including C2, L2₂₀₁₄ and L2₂₀₁₅, L1₂₀₁₄ and L1₂₀₁₅ that gather on the right part of the graph. The loading plots (Fig. 2B) revealed the contribution of each variable to the descriptive component and therefore highlights which variables are the most responsible for the discrimination between the genotypes. As shown in Fig. 1B, all incubation period values are distributed in the right of the graph whereas main of the other variables (AUDPC, NIV and DON contents, loss of thousand-grain weight, ergosterol) are on the left part. Therefore, the PCA analysis highlights that, compared to C1 and C3, C2 but most importantly L2 and L1 are characterized by the highest values of incubation period and the lowest values of

AUDPC, loss of thousand grains weight, toxin and ergosterol contents.

Values of AUDPC, determined for the five genotypes inoculated with the four *F. culmorum* strains are reported in Fig. 3. L1, L2 and C2 exhibited lower AUDPC values than C3 or C3 with all *F. culmorum* strains. AUDPC values assigned to L1 were about 3 to 50 fold lower than those determined with C1 and C3 genotypes. For L2 and C2, when AUDPC values were significantly lower than those associated with C1 and C3 for three of the *F. culmorum* isolates, FC-T5-06, FC-T7-06 and FC-10-11, the trend was shared for the FC-01-12 strain but without being statistically significant.

Regarding incubation period and loss of thousand grains weight (Table 1), the same tendencies as those evidenced by AUDPC values were observed. For example, L1 was characterized by the highest values of incubation period whatever the inoculated strains, with differences, however, that were only statistically significant for one of the inoculated strains. When considering the loss of

Table 1. Thousand grains weight loss (relative to weight measured in non-inoculated controls) and incubation time measured on each genotype after inoculation with *F. culmorum* strains.

Genotype	Thousand grains weight loss (g)				Incubation time (d)			
	FC-T5-06	FC-T7-06	FC-10-11	FC-01-12	FC-T5-06	FC-T7-06	FC-10-11	FC-01-12
L1	3.54 ± 2.42 ^a	3.54 ± 4.87 ^a	5.55 ± 7.68 ^{a,b}	7.91 ± 2.38 ^a	12.33 ± 12.32 ^c	22.67 ± 2.6 ^a	21.67 ± 0.35 ^a	14.33 ± 16.31 ^b
L2	4.25 ± 2.56 ^a	7.51 ± 7.38 ^a	3.95 ± 3.72 ^{a,b}	5.72 ± 5.34 ^a	11.67 ± 14.3 ^{b,c}	14.67 ± 11.84 ^a	13.33 ± 16.73 ^a	11 ± 2.15 ^{a,b}
C1	14.25 ± 4.57 ^a	16.53 ± 4.54 ^a	13.8 ± 5.96 ^b	14.54 ± 5.88 ^a	6.33 ± 26.78 ^a	12 ± 14.24 ^a	12.33 ± 17.06 ^a	10 ± 33.88 ^a
C2	9.85 ± 7.52 ^a	4.82 ± 1.48 ^a	9.97 ± 4.01 ^{a,b}	14.35 ± 9.19 ^a	10.33 ± 15.31 ^{a,c}	15 ± 2.75 ^a	16.67 ± 8.31 ^a	11 ± 6.14 ^a
C3	9.27 ± 4.32 ^a	4.71 ± 1.48 ^a	3.12 ± 0.34 ^a	12.85 ± 5.26 ^a	8 ± 4.8 ^{a,b}	12.33 ± 9.74 ^a	13.33 ± 25.37 ^a	10 ± 44 ^a

Data are means ± standard deviation using three biological replicates.

Means in the same line followed by different letters are significantly different (p -value < 0.05).

Table 2. Concentrations of ergosterol and mycotoxins in kernels of the five durum wheat genotypes inoculated with FC-T5-06, FC-T7-06, FC-10-11 or FC-01-12 *Fusarium culmorum* strains.

Year	Genotype	Toxin ($\mu\text{g g}^{-1}$)				Ergosterol ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
		FC-T5-06 ^a	FC-T7-06 ^a	FC-10-11 ^b	FC-01-12 ^b	FC-T5-06 ^a	FC-T7-06 ^a	FC-10-11 ^b	FC-01-12 ^b
2015	L1	4.63±2.73	1±0	2.47±1.47	10.85±2.34	8.74±2.37	6.03±0.06	6±0	11.8±2.1
	L2	6.37±3.94	2.95±2.07	23.54±4.47	36.32±5.39	15.8±9.56	15.49±8.24	26.27±17.78	46.08±9.4
	C1	19.57±5.62	2.89±1.9	3.49±4.32	19.25±15.47	37.2±6.66	10.38±5.32	8.08±3.6	25.16±17.32
	C2	31.15±12.89	10.09±2.06	56.52±13.91	28.07±7.5	73.82±29.64	51.79±15.28	102.62±41.64	107.37±85.12
	C3	39.34±8.18	7.78±2.17	32.64±5.43	40±14.26	82.73±39.6	34.42±10.61	47.19±6.96	56.96±10.61
2014	L1	19.33±8.5	23.05±15.9	13.81±9.29	9.27±2.89	31.89±13.77	43.64±18.54	22.22±13.56	30.59±14.64
	L2	24.8±6.59	34.51±7.82	12.3±2.74	15.05±3.08	45.62±11.66	55.92±12.42	16.61±5.92	41.01±13.97

Data are means ± standard deviation using three biological replicates.

^aNivalenol quantification. ^bDeoxynivalenol quantification.

Table 3. Spearman's Rank Correlation Coefficient between AUDPC, ergosterol and toxins.

Strain	Variable	FC-T5-06	FC-T7-06	FC-10-11	FC-01-12
		AUDPC			
FC-T5-06	ergosterol	0.931*	–	–	–
FC-T7-06		–	0.856*	–	–
FC-10-11		–	–	0.936*	–
FC-01-12		–	–	–	0.807*
FC-T5-06	Nivalenol	0.964*	–	–	–
FC-T7-06	Nivalenol	–	0.814*	–	–
FC-10-11	Deoxynivalenol	–	–	0.959*	–
FC-01-12	Deoxynivalenol	–	–	–	0.793*
		Toxin			
FC-T5-06	ergosterol	0.960*	–	–	–
FC-T7-06		–	0.960*	–	–
FC-10-11		–	–	0.951*	–
FC-01-12		–	–	–	0.771*

*Significant correlation (p-value < 0.05).

thousand grains weight, the lowest values were obtained for L1 but the differences among genotypes were rarely statistically significant, mainly as a result of great variations between the blocks.

Altogether, the previous data suggest that, the genotypes C2, L2 and, most significantly, L1 are able to slow down the appearance of the first FHB symptoms but also to reduce the spread of the disease.

The weak FHB susceptibility of the L1 line was also supported by the ergosterol and mycotoxin data (Table 2). Ergosterol values, used to estimate the extent of fungal contamination, vary according to the fungal isolate and range between 6 and 12 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the L1 grains while these values reach as much as 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ in grains of the most susceptible cultivars (C1 and C3). When examining mycotoxin data, it is also clearly apparent that the amounts of NIV and DON accumulated in L1 kernels, which are most often lower than 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, are among the weakest assessed in our study.

Lastly, data distribution reported on the loading plots (Fig. 2B) also suggest the potential occurrence of correlations between phenotypic parameters. Spearman's coefficient correlations summarized in Table 3 for each

inoculated *F. culmorum* strain indicate positive and significant correlations between AUDPC and ergosterol content, AUDPC and TCTB content and finally, between ergosterol and mycotoxin contents. Interestingly, coefficient values appear as modulated according to the considered strain (higher values for FC-T5-06 and FC-10-11, lower values for FC-T7-06 and FC-01-12) but not to the NIV/FX or DON/3-ADON chemotype. Similarly, as it is indicated on Fig. 3, the aggressiveness of the strains was not tied with their chemotype. Indeed, the highest and lowest values of AUDPC were obtained with the two NIV/FX strains, FC-T5-06 and FC-T7-06.

Phenolic acids composition of the breeding lines and commercial cultivars.

Free and cell-wall-bound phenolic acid contents were analyzed in non-inoculated grains of the five genotypes harvested at maturity (Table 4). Whatever the considered genotype and class of phenolic acids, similar HPLC-UV profiles were obtained. Only two free phenolic acids, vanillic (0.46-0.65 $\mu\text{g g}^{-1}$) and trans-ferulic acids (0.29-0.50 $\mu\text{g g}^{-1}$), were detected in grains at very low amounts, the sum of which equaled 0.1% of the total quantified phenolic acids. The highest levels of vanillic acid were quantified in grains of the L1 breeding line whereas the amounts of trans-ferulic acid were significantly higher in grains of the L1 and C2 genotypes. As regard to cell-wall bound phenolic acids, five monomers (*cis*-ferulic, *trans*-ferulic, *p*-coumaric, vanillic and sinapic acids) and four ferulic acid dehydrodimers or diferulic acids [8-5' DiFA (open form), 5-5' DiFA, 8-O-4' DiFA and 8-5' benDiFA (benzofuran form) were quantified in all grain samples of the five genotypes. Since it is well admitted that cinnamic acids occur naturally in the predominant *trans* configuration and that exposure to UV light can induce photochemical isomerization to the *cis* configuration (Clifford *et al.*, 2008), we decided to report cell-wall-bound ferulic acid as the sum of the concentrations of the two isomers. As it clearly appears in Table 4, ferulic acid was the major cell-wall-bound phenolic acid in grains regardless the genotype, representing 67-69% of the total quantified phenolic acids, and 93-95% of the total phenolic acid monomers. *p*-Coumaric acid (between 13.0-21.6 $\mu\text{g g}^{-1}$) was

Table 4. Free and cell-wall-bound phenolic acid contents ($\mu\text{g g}^{-1}$) in non-inoculated kernels of the five genotypes harvested at maturity in 2015.

Phenolic acid	Genotype				
	L1	L2	C1	C2	C3
Free phenolic acid					
<i>Trans</i> -ferulic acid	0.50 ± 0.05 ^b	0.29 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.04 ^a	0.46 ± 0.04 ^b	0.30 ± 0.05 ^a
Vanillic acid	0.65 ± 0.03 ^b	0.46 ± 0.07 ^a	0.53 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	0.52 ± 0.05 ^a
Cell-wall-bound phenolic acid					
<i>p</i> -Coumaric acid	21.62 ± 8.9 ^b	21.48 ± 5.43 ^b	13.03 ± 2.52 ^a	15.02 ± 0.72 ^{ab}	14.14 ± 1.22 ^{ab}
Ferulic acid	817.22 ± 345.52 ^b	631.26 ± 134.77 ^{ab}	556.28 ± 112.97 ^{ab}	496.23 ± 51.34 ^a	496.04 ± 84.77 ^a
Sinapic acid	17.61 ± 4.29 ^a	17.52 ± 9.86 ^a	19.62 ± 12.86 ^a	10.34 ± 3.75 ^a	13.43 ± 10.66 ^a
Vanillic acid	6.25 ± 2.12 ^b	5.07 ± 1.07 ^{ab}	4.63 ± 1.02 ^{ab}	3.72 ± 0.09 ^a	3.96 ± 0.63 ^a
8-5' DiFA	34.82 ± 14.78 ^b	25.46 ± 4.47 ^{ab}	23.43 ± 4.87 ^{ab}	20.06 ± 3.06 ^a	20.03 ± 1.54 ^a
5-5' DiFA	72.47 ± 42.59 ^a	49.91 ± 13.36 ^a	53.38 ± 19.33 ^a	38.77 ± 6.76 ^a	39.83 ± 8.95 ^a
8-O-4' DiFA	110.13 ± 53.73 ^b	79.39 ± 19.60 ^{ab}	78.22 ± 18.26 ^{ab}	64.73 ± 9.83 ^a	65.45 ± 7.56 ^a
8-5' benDiFA	106.82 ± 49.73 ^a	83.16 ± 19.78 ^a	80.59 ± 22.84 ^a	65.92 ± 8.64 ^a	66.80 ± 8.30 ^a
Sum of cell-wall-bound monomers	862.70 ± 359.87 ^b	675.33 ± 141.97 ^{ab}	593.55 ± 128.60 ^{ab}	525.32 ± 50.34 ^a	527.57 ± 88.01 ^a
Sum of cell-wall-bound DiFAs	324.24 ± 160.79 ^b	237.93 ± 56.75 ^{ab}	235.61 ± 65.05 ^{ab}	189.48 ± 28.16 ^a	192.12 ± 25.24 ^a

Data are means ± standard deviation using three biological replicates.

Means in the same line followed by different letters are significantly different (p-value < 0.05).

DiFA = Ferulic acid dehydrodimer.

8,5'benDiFA = 8-5' ferulic acid dehydrodimer (benzofuran form).

the second most abundant cell-wall-bound phenolic acid, followed by sinapic (10.3-17.6 $\mu\text{g g}^{-1}$) and vanillic (3.7-6.2 $\mu\text{g g}^{-1}$) acid. The highest levels of cell-wall-bound ferulic, *p*-coumaric and vanillic acids were determined in the grains of L1 and L2 genotypes, although the differences between genotypes were not statistically significant. This lack of significant differences certainly results from the high standard deviations values observed between the three blocks of replications. As regard DiFA composition, the predominant ones were 8-O-4' DiFA and 8-5' benDiFA, followed by 5-5' DiFA and 8-5' DiFA (34, 34, 21 and 11% of the total DiFA), and their sum equaled approximately 27% of the total identified phenolic acids. Once again, the highest levels of 8-O-4' DiFA and 8-5' DiFA, and consequently of total dimers of ferulic acid, were quantified in kernels of the L1 breeding lines.

To sum up, the overall results on phenolic acid composition highlight the predominance of monomeric and dimeric forms of ferulic acid in mature durum wheat grains together with superior concentrations of total free and cell wall bound phenolic acids in grains of the L1 breeding line.

Relationship between phenolic acids composition and degree of FHB susceptibility. With the aim of investigating a potential contribution of phenolic acids to durum wheat FHB resistance, Spearman correlation coefficients were computed between the phenotypic data used to assess resistance (incubation period, AUDPC, toxin and ergosterol contents) and concentration of each phenolic acid reported in Table 4. Correlation coefficients are reported in Table 5. The most significant and negative correlation (Spearman's coefficient values ranged between 0.55 and 0.75) was observed between *p*-coumaric acid

and ergosterol amounts, regardless on the *F. culmorum* strain. Additional significant correlations were observed that, however, were highly dependent from the considered fungal strain. For instance, *p*-coumaric acid content was shown to negatively correlate with NIV concentrations (FC-T5-06 and FC-T7-06) but not with DON. In addition, free ferulic acid content was also observed as frequently involved in significant negative correlation events: free ferulic acid content was shown to correlate with AUDPC values for FC-T7-06, FC-10-11 and FC-01-12, with ergosterol content for the two DON/3-ADON strains, and with DON accumulation for FC-10-11. When considering the sum of phenolic acid monomers or dimers, no significant correlation was emphasized (data not shown).

DISCUSSION

In Algeria, but also in other grain-growing countries, a major challenge for durum wheat breeders is to provide genotypes with high level of field resistance to FHB, allowing to significantly reduce yield loss and associated contamination of grains with mycotoxins. Development of such genotypes is largely hindered by the lack of effective resistance gene (Prat *et al.*, 2014) and most of the cultivated durum wheat cultivars currently available lack the high levels of resistance exhibited by common wheat cultivars. As supported by the publications of Elias *et al.* (2005) and Talas *et al.* (2011), some durum wheat landraces from North Africa (Tunisia) and Western Asia (Syria), where wheat domestication has occurred between 12 000 and 10 000 years BP, can be promising sources of resistance to FHB. A breeding program was implemented at ENSA Algiers, based on crosses involving durum wheat cultivars

Table 5. Spearman's Rank Correlation Coefficient between phenolic acids and phenotypic variables.

Variable	Strain	Cell-wall-bound phenolic acids							Free phenolic acids			
		<i>p</i> -Coumaric acid	Ferulic acid	Sinapic acid	Vanillic acid	5,5' DiFA	8-O-4' DiFA	8,5' DiFA	8,5' benDiFA	Vanillic acid	<i>trans</i> -Ferulic acid	
AUDPC	FC-T5-06	-0.775*	-0.314	0.011	-0.304	-0.096	-0.264	-0.393	-0.286	-0.163	-0.354	
	FC-T7-06	-0.504	-0.150	-0.125	-0.129	-0.129	-0.214	-0.268	-0.229	-0.148	-0.532*	
	FC-10-11	-0.432	-0.025	0.108	0.032	0.045	-0.091	-0.154	-0.093	-0.097	-0.569*	
	FC-01-12	-0.361	-0.182	0.146	-0.079	-0.043	-0.164	-0.279	-0.150	-0.411	-0.596*	
Ergosterol	FC-T5-06	-0.747*	-0.277	-0.177	-0.304	-0.234	-0.324	-0.411	-0.356	-0.030	-0.318	
	FC-T7-06	-0.573*	-0.034	0.020	-0.011	0.065	-0.047	-0.123	-0.095	-0.013	-0.449	
	FC-10-11	-0.546*	-0.113	0.004	-0.066	0.002	-0.109	-0.210	-0.159	-0.096	-0.572*	
	FC-01-12	-0.657*	-0.396	-0.111	-0.314	-0.214	-0.371	-0.464	-0.379	-0.329	-0.671*	
Toxin	Nivalenol	FC-T5-06	-0.754*	-0.336	-0.100	-0.343	-0.246	-0.389	-0.471	-0.389	-0.170	-0.329
	Nivalenol	FC-T7-06	-0.591*	0.014	0.057	0.022	0.151	0.057	-0.050	-0.022	0.088	-0.362
	Deoxynivalenol	FC-10-11	-0.380	0.022	0.176	0.082	0.136	0.022	-0.072	0.018	-0.117	-0.645*
	Deoxynivalenol	FC-01-12	-0.275	-0.157	0.046	-0.054	-0.082	-0.243	-0.286	-0.179	-0.404	-0.504
Incubation time	FC-T5-06	0.629*	0.207	-0.087	0.133	-0.045	0.133	0.309	0.140	0.119	0.345	
	FC-T7-06	0.369	0.168	0.144	0.144	0.126	0.223	0.227	0.220	0.314	0.560*	
	FC-10-11	0.301	0.042	-0.249	-0.049	-0.120	0.067	0.158	0.053	0.453	0.537*	
	FC-01-12	0.477	0.176	-0.113	0.132	0.072	0.195	0.373	0.143	0.306	0.414	

* Significant correlation (p-value < 0.05).

DiFA = Ferulic acid dehydrodimers.

8,5' benDiFA = 8-5' ferulic acid dehydrodimer (benzofuran form).

grown in Europe and Syria. This program provided two potentially interesting lines here referred to as L1 and L2 (Touati-Hattab *et al.*, 2016). Based on field experiments in Algeria with four *F. culmorum* strains, the results reported in the present study demonstrated that the two breeding lines, and most importantly L1, were less susceptible to FHB than a set of commercial cultivars. Indeed, AUDPC values, toxin and ergosterol content associated with L1 were 5 to 10 fold lower than those assessed for susceptible commercial cultivars.

Previous data were obtained using a spray inoculation method, as frequently applied to screen FHB resistance in wheat (Prat *et al.*, 2014). According to Miedaner *et al.* (2003), spray inoculation, compared to single-floret inoculation, is more likely to mimic natural infection conditions. Spray inoculation has an additional advantage over point inoculation, since it allows considering the two first components of FHB resistance, type I (resistance to initial infection and/or penetration) and type II (resistance to spread of disease within the spike) while point inoculation can only detect type II resistance. According to the disease-related data we have quantified, the L1 breeding line seems to exhibit both types I and II FHB resistance. Resistance to initial infection was supported by the values of incubation period and resistance to spread of disease was emphasized by the very low values of AUDPC and ergosterol contents. Our data, however, do not allow to draw conclusions on the three additional traits of resistance described by Miller *et al.* (1985), *e.g.* type III (resistance to kernel infection), type IV (tolerance to infection) and type V (resistance to DON accumulation through metabolic transformation of DON and/or inhibition of the mycotoxin biosynthetic pathway).

To go further and identify potential biochemical traits that could be linked with the lowest FHB susceptibility of the L1 breeding line, we have compared the phenolic acid compositions in grains of the five genotypes considered in the current study. Indeed, phenolic acids are likely to operate in defense response through direct interference with the fungus or through the reinforcement of plant structural components to act as a mechanical barrier against the pathogen. Alternatively, their acknowledged *in vitro* ability to inhibit mycotoxin production (Boutigny *et al.*, 2008; Ferruz *et al.*, 2016; Pani *et al.*, 2016) suggests that they can also specifically reduce trichothecene accumulation *in planta*. Our data evidenced a very weak fraction of free phenolic acids in mature kernels of durum wheat (less than 0.1% of total phenolic acid in kernels), mainly composed of vanillic and ferulic acid, corroborating the previously published results of Li *et al.* (2008), Irakli *et al.* (2012) and Shewry *et al.* (2013). When considering bound phenolic acids, their sum ranged between 0.5 and 0.8 g kg⁻¹ for monomeric forms and 0.2 to 0.3 g kg⁻¹ for dimeric forms. These values are significantly higher than those reported in the literature (Hernandez *et al.*, 2011; Shewry *et al.*, 2013) that, however, were obtained with other genotypes grown in other cultivation areas, two factors that can significantly impact phenolic acid accumulation in kernels (Li *et al.*, 2008). Ferulic acid followed by *p*-coumaric acid were the two predominant conjugated monomeric forms of phenolic acids while dimeric forms were essentially composed of ferulic acid dehydrodimers, supporting previously published data on cell-wall bound phenolic acid profiles in wheat grains (Atanasova-Penichon *et al.*, 2016; Laddomada *et al.*, 2015). When classifying the five genotypes considered in our study according to their content in phenolic acids, the

L1 breeding line always ranked in the top even though differences were not systematically significant, mainly as a result of great variations between the blocks.

The use of Spearman rank correlations allowed us to highlight a significant and negative correlation between *p*-coumaric acid and ergosterol level, regardless of the inoculated *F. culmorum* strain. Negative correlations involving free ferulic acid were also observed but their significance was dependent on the fungal strain. Actually, *p*-coumaric acid is the product of the enzymatic non-oxidative deamination of phenylalanine catalyzed by Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and is also one of the main precursors of phenolic compounds. Therefore, our data are consistent with the key role ascribed to PAL and more generally to the phenylpropanoid pathway in the plant defense system (Mandal *et al.*, 2009), including defense against *Fusarium* species responsible for FHB in wheat (Sorahinobar *et al.*, 2016). Jointly with ferulic acid, *p*-coumaric acid can significantly contribute to plant resistance mechanisms through cell wall fortification and lignification (Atanasova-Penichon *et al.*, 2016). Our results evidencing higher levels of *p*-coumaric acid in the durum wheat genotypes characterized by the lowest ergosterol contents corroborate the importance of cell wall composition in preventing the diffusion of *F. culmorum* (type II of FHB resistance).

To go further in the search of biochemical traits that could be involved in the lowest susceptibility of the L1 breeding lines, it would certainly be highly relevant to consider, in addition to phenylpropanoids, other candidate compounds involved in the cell wall composition. According to literature, contents of thionins (Pelegri and Franco, 2005) and hydroxyproline-rich glycoproteins (Deepak *et al.*, 2010), composition and esterification of pectin (Lionetti *et al.*, 2015), and abundance in some nutrients including Ca, K, Si and Fe (Lahlali *et al.*, 2016) could also contribute to the FHB type II resistance by reinforcing the mechanical properties of the cell wall.

In conclusion, overall, the results presented herein evidenced the possibility to select new durum wheat material that is adapted to Algerian climatic constraints and exhibits an improved tolerance to FHB. The environmental stability of this improved tolerance requires however to be confirmed by repeating inoculation experiments over environments (years and locations). In addition, our data represent a new argument for the role of cell wall composition in type II resistance to *F. culmorum* and, in accordance with Lionetti *et al.* (2015) and Lahlali *et al.* (2016), suggest that cell wall traits could potentially be used as molecular markers for the breeding of durum wheat cultivars with enhanced resistance to FHB.

ACKNOWLEDGEMENTS

Salah Hadjout thanks the National School of Agronomy of Algiers for financial support. He also thanks the

«Comité Mixte d'Evaluation et de Prospective de la coopération scientifique franco-algérienne» CMEP PHC TASSILI for support through the «Agence Française pour la promotion et l'enseignement supérieur, l'accueil et la mobilité internationale» during the different stays at MycSA laboratory, INRA Bordeaux Aquitaine, France.

REFERENCES

- Atanasova-Penichon V., Barreau C., Richard-Forget F., 2016. Antioxidant secondary metabolites in cereals: potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. *Frontiers in Microbiology* **7**: 566.
- Bai G., Shaner G., 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 135-161.
- Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Sémon E., Richard-Molard D., 2001. Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives and Contaminants* **18**: 998-1003.
- Boutigny A.L., Richard-Forget F., Barreau C., 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* **121**: 411-423.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J.A., 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* **128**: 1-26.
- Clifford M.N., Kirkpatrick J., Kuhnert N., Roozendaal H., Salgado P.R., 2008. LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry* **106**: 379-385.
- Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Juan C., Ferrer E., Manes J., 2015. *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**: 540-551.
- Deepak S., Shailasree S., Kini R.K., Muck A., Mithöfer A., Shetty S.H., 2010. Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. *Journal of Phytopathology* **158**: 585-593.
- Elias E.M., Mantey F.A., Stack R.W., Kianian S.F., 2005. Breeding efforts to develop *Fusarium* head blight resistant durum wheat in North Dakota. In: Canty S.M., Boring T., Wardwell J., Siler L., Ward R.W., (eds). *Proceedings of the 2005 National Fusarium Head Blight Forum*, Michigan State University: 25-26.
- Ferruz E., Atanasova-Penichon V., Bonnin-Verdal M.N., Marchegay G., Pinson-Gadais L., Ducos C., Loran S., Arino A., Barreau C., Richard-Forget F., 2016. Effects of phenolic acids on the growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides*. *Molecules* **21**: 449.
- Gauthier L., Bonnin-Verdal M.N., Marchegay G., Pinson-Gadais L., Ducos C., Richard-Forget F., Atanasova-Penichon V., 2016. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal of Food Microbiology* **221**: 61-68.

- Hazel C.M., Patel S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* **153**: 51-59.
- Hernandez L., Afonso D., Rodriguez E.M., Diaz C., 2011. Phenolic compounds in wheat grain cultivars. *Plant Foods and Human Nutrition* **66**: 408-415.
- Ichinoe M., Kurata H., Sugiura Y., Ueno Y., 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 1364-1369.
- Irakli M.N., Samanidou V.F., Biliaderis C.G., Papadoyannis I.N., 2012. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry* **134**: 1624-1632.
- Jurado M., Vazquez C., Patino B., Gonzalez-Jaen M.T., 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 562-568.
- Laddomada B., Caretto S., Mita G., 2015. Wheat Bran Phenolic Acids: Bioavailability and stability in whole wheat-based foods. *Molecules* **20**: 15666-15685.
- Lahlali R., Kumar S., Wang L.P., Forseille L., Sylvain N., Korbas M., Muir D., Swerhone G., Lawrence J.R., Fobert P.R., Peng G., Karunakaran C., 2016. Cell wall biomolecular composition plays a potential role in the host type II resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Frontiers in Microbiology* **7**: 910.
- Laraba I., Bouregghda H., Abdallah N., Bouaicha O., Obanor F., Moretti A., Geiser M.D., Kim H., McCormick S.P., Proctor R.H., Kelly A.C., Ward T.J., O'Donnell K., 2017. Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genetics and Biology* **103**: 34-41.
- Li L., Shewry P.R., Ward J.L., 2008. Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 9732-9739.
- Lionetti V., Giancaspro A., Fabri E., Giove S.L., Reem N., Zabolina O.A., Blanco A., Gadaleta A., Bellincampi D., 2015. Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biology* **15**: 6.
- Mandal S., Mitra A., Mallick N., 2009. Time course study on accumulation of cell wall-bound phenolics and activities of defense enzymes in tomato roots in relation to *Fusarium wilt*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 795-802.
- Miedaner T., Moldovan A., Ittu M., 2003. Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to *Fusarium* head blight in a multi-environment wheat trial. *Phytopathology* **93**: 1068-1072.
- Miller J.D., Young J.C., Sampson D.R., 1985. Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology* **113**: 359-367.
- Pani G., Dessi A., Dallochio R., Scherm B., Azara E., Delogo G., Migheli Q., 2016. Natural phenolic inhibitors of trichothecene biosynthesis by the wheat fungal pathogen *Fusarium culmorum*: a computational insight into the structure-activity relationship. *Plos One* **11**: 6.
- Pastaria, 2015. Geography of the Durum Wheat crop. http://www.openfields.it/sito/wp-content/uploads/2016/01/PASTARIA2015_N06_en-artOF.pdf
- Pelegrini P.B., Franco O.L., 2005. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37**: 2239-2253.
- Prat N., Buerstmayr M., Steiner B., Robert O., Buerstmayr H., 2014. Current knowledge on resistance to *Fusarium* head blight in tetraploid wheat. *Molecular Breeding* **34**: 1689-1699.
- Shewry P.R., Hawkesford M.J., Piironen V., Lampi A.M., Gebreuer K., Boros D., Andersson A.A.M., Aman P., Rakszegi M., Bedo Z., Ward J.L., 2013. Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 8295-8303.
- Sorahinobar M., Niknam V., Ebrahimzadeh H., Soltanloo H., Behmanesh M., Enferadi S.T., 2016. Central role of salicylic acid in resistance of wheat against *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**: 477-491.
- Talas F., Longin F., Miedaner T., 2011. Sources of resistance to *Fusarium* head blight within Syrian durum wheat landraces. *Plant Breeding* **130**: 398-400.
- Touati-Hattab S., Barreau C., Verdal-Bonnin M.N., Chereau S., Richard-Forget F., Hadjout S., Mekliche L., Bouznad Z., 2016. Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European Journal of Plant Pathology* **145**: 797-814.

Received March 27, 2017

Accepted September 15, 2017

ملخص

لفح السنابل (FHB) مرض يصيب القمح درس في العديد من دول العالم عدا الجزائر اين ينتج القمح الصلب واللين بكميات كبيرة ويستهلك على شكل دقيق وخبز . حيث يؤدي هذا المرض الى خسائر فادحة في الانتاج كما ان العوامل المسببة للمرض تضر بجودة الحبوب من خلال افرازات سامة تعرف بالميكوتوكسين مما يشكل خطرا على صحة الانسان والحيوان.

يهدف هذا العمل الى دراسة هذا المرض وذلك بتحديد انواع الفطريات المسببة له على القمح بالجزائر وتقويم قدرة عزلات *F. culmorum* على افراز السموم الفطرية بالمخبر , كما اهتمنا بتحديد نوعية وكمية مادة الميكوتوكسين المفترزة من طرف هذه العزلات الفطرية.

اكنت تحاليل البيولوجيا الجزيئية بواسطة تقنية (PDR-spécifique) النتائج المحصل عليها من خلال الدراسة المورفولوجية حيث بينت ان الاصناف الخمسة التالية : *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* و *F. graminearum* , تسببت بحدوث المرض كما اوضحت ان الصنف *F. culmorum* هو المسبب الرئيسي للمرض بالجزائر .

تحديد انواع الميكوتوكسين المفترزة من طرف اربعون عزلة من صنف *F. culmorum* تم بواسطة تقنيتي (PCR) و (PCR -Q) بينت النتائج ان جميع العزلات المدروسة لها القدرة على افراز السموم الفطرية . كما اظهر تضخيم *Tri 12 3ADON* و *Tri 12 NIV* ان 95% من العزلات هي من النوع DON بينما يم ثل النوع NIV 5% من العزلات المدروسة.

كما تم تأكيد نوعية السموم المفترزة من طرف اربع عزلات من الصنف *F. culmorum* باستعمال تقنية (PCR-Taq Man) بواسطة مسبار خاص بالنوعين من الصنف *F. culmorum* .

تبين النتائج ان عزلتين من النوع NIV/FX بينما العزلتين الاخرين من النوع DON/3-ADON . تحاليل TCTB بواسطة تقنية (HPLC/DAD) , مكنت من تحديد قدرتها على انتاج السموم حيث ينتج النوع DON/3-ADON نسب اعلى من السموم مقارنة بالعزلتين من النوع NIV/FX.

العزلات الاربع كانت ممرضة على سنابل القمح من مختلف الاصناف ; كما تم تقييم طيلة سنتين مدى حساسية نوعيتين من القمح الصلب ونوعيتين من القمح الصلب (introduite et autochtone) و سلالاتين جديدتين اتجاه هذه العزلات الاربع من الصنف *F. culmorum* من خلال الاعداء الاصطناعي على مستوى الحقل.

بينت النتائج وجود علاقة ما بين نمو الفطر على مستوى حبة القمح وكمية الميكوتوكسين المتراكمة مع اختلاف كبير في حساسية حسب الصنف المدروس . حيث اظهرت كل من النوعيتين المحليتين من القمح الصلب والسلالتان الجديدتان للقمح الصلب مستوى من المقاومة لمرض الفح السنابل مع تسجيل تراجع بنسبة التريكويسين المتراكمة.

واخيرا تم تقييم الاحماض الفينولية في جميع اصناف وسلالات القمح لمعرفة ان كان محتواها على ارتباط بتراكم هذه السموم الفطرية .

هذا العمل يعتبر اول تقرير تناول دراسة اكثر اصناف القمح زراعة بالجزائر من اجل تقييم مدى حساسيتها للاصناف المحلية *F. culmorum* في المنطقة الشبه جافة.

الكلمات المفتاحية: لفح السنابل , فيزاريوم كيلموروم , التحليل الجزيئي, تريكويسان , الصنف ب , نوعية مقومة.