

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر

ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH-ALGER

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences agronomiques

Option: Agroécosystème et stress biologique

Thème

Étude de la diversité génétique, de la pathogénicité et du potentiel toxigène de *Fusarium culmorum* (Wm.G. Smith) Sacc. agent de la pourriture racinaire et de la fusariose de l'épi du blé en Algérie

Par: Laraba Imane

Soutenu le: 28/02/2018

Membres de jury

Président: M. Bouznad Z.

(Professeur à l'ENSA)

Directeur de thèse: M^{me} Boureghda H.

(Professeur à l'ENSA)

Co-directeur de thèse: M. O'Donnell K.

(Maitre de recherche à ARS-USDA, Peoria, IL, USA)

Examineurs

M^{me} Louanchi M.

(Professeur à l'ENSA)

M^{me} Krimi Z.

(Professeur à l'USD, Blida)

M. Benbelkacem A.

(Directeur de recherche à l'INRAA, Constantine)

Années universitaires: 2014/2018

Remerciements

Avant toute ligne toute phrase, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à the one and the only one Kerry O'Donnell pour sa confiance, son accueil et pour tout le savoir que vous m'avait transmis. "Kerry, we had this discussion before, without you I'm not thing, thank you for responding to my email that day in 2014, thank you for believing in not thing, thank you for the chance that you did give me that day, thank you for the doors that you did open for me and the ones that you keep opening, you showed me how a researcher should be, how a human being should be.....As I promised you I will do my best to transfer all what I learned from you, and I will help anybody who needs help".

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma promotrice M^{me} BOUREGHDA H. pour avoir accepté de m'encadrer pour la deuxième fois, pour sa disponibilité et ses conseils; qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

J'exprime mon grand respect et mes remerciements à :

M. BOUZNAD Z. pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, M^{me} LOUANCHI M., M^{me} Krimi Z. et M. Benbelkacem A. de m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

M. Keddad A. qui a suivi avec intérêt l'élaboration de ce travail. Ses remarques et ses corrections m'ont permis d'améliorer la qualité de mon document.

*Ces travaux, tels qu'ils sont présentés, n'auraient pas été possibles sans l'aide de mes différents collaborateurs. Merci à tous les chercheurs de l'unité NACUR, ARS-USDA, Peoria: **Todd Ward, Bop Proctor, Kim Hye-Soen, Martha Vaughan, Mark Busman, Suzy, Gail, Jen**.....etc. Thank you for your honesty, your kindness, your help....Thank you for the good time we spent together in every single minute....Thank you for trying to be a second family for me.*

Mes parents qui m'ont aidé dans la réalisation de l'essai en plein champs et les prospections.

Aicha Mohammedi**, ma sœur, collego et repère, celle qui a toujours cru en moi dans toutes les circonstances même quand j'ai touché le fond she was right here to support me...thank you for staying until the end. **Oussama, Ouair Nouredin, Rahim Nouredin, Safou Berrahia et Nawal Bentoumi** pour leur soutien sur tous pendant le dernier mois. My second family in Peoria: **Soukaina, Ancle Mustapha, Amir, Anti Maher, Shama.

Dédicace

À mon très cher grand père.

« Que Dieu le bénisse et l'accueille dans son vaste paradis »

A ma chère grande mère que DIEU la garde et la protège.

Je dédie ce travail à ma chère mère qui s'est tant battue pour mon bien être, pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus difficiles épreuves. A mon père pour sa tendresse et sa patience, qui a tant sacrifié pour nous.

Je ne trouve pas les mots pour remercier ces deux personnes les plus chères dans ma vie, aucune expression n'estime ma reconnaissance et ma fierté d'avoir des parents comme vous.

À mon cher frère et à ma chère sœur.

« Que dieu vous bénisse et vous gardes pour moi »

À toute ma famille.

À mes très chères amies: Aicha, Safia, Samia, Asma, Nawal, Kawther

À Oussama.

À mes collègues du département de botanique.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES TABLEAUX | I |
| LISTE DES FIGURES | II |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | IV |
| I. INTRODUCTION | 1 |
| II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 4 |
| II.1. LA CULTURE DU BLÉ | 4 |
| II.1.1. Importance de la culture du blé | 4 |
| II.1.1.1. Importance de la culture du blé dans le monde | 4 |
| II.1.1.2. Importance de la culture du blé en Algérie | 4 |
| II.1.2. Les contraintes biotiques et abiotiques de la culture du blé | 5 |
| II.2. LA POURRITURE DU COLLET ET LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ..... | 5 |
| II.2.1. Importance économique de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi | 6 |
| II.2.2. Agents responsables de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi | 6 |
| II.2.3. Distribution des agents responsables de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi .. | 7 |
| II.2.4. Distribution de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi | 7 |
| II.2.5. Symptômes de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi | 8 |
| II.3. LE GENRE <i>FUSARIUM</i> | 8 |
| II.3.1. Taxonomie..... | 10 |
| II.3.2. Identification des espèces de <i>Fusarium</i> | 10 |
| II.3.2.1. Identification morphologique des espèces de <i>Fusarium</i> | 10 |
| II.3.2.2. Identification biologique des espèces de <i>Fusarium</i> (Typage sexuel) | 12 |
| II.3.2.3. Identification moléculaire des espèces de <i>Fusarium</i> | 13 |
| II.4. MYCOTOXINES | 14 |
| II.4.1. Les trichothécènes | 15 |
| II.4.1.1. Structure chimique des trichothécènes | 15 |
| II.4.1.2. Biosynthèse des trichothécènes | 16 |
| II.4.1.3. Rôle des trichothécènes dans la pathogénicité | 16 |
| II.4.2. Les fumonisines..... | 18 |
| II.4.3. La zéaralénone..... | 18 |
| II.5. DONNÉES SUR <i>FUSARIUM CULMORUM</i> | 20 |
| II.5.1. Distribution géographique de <i>F. culmorum</i> | 20 |

| | |
|---|-----------|
| II.5.2. Caractéristiques morphologiques de <i>F. culmorum</i> | 20 |
| II.5.3. Métabolites secondaires synthétisés par <i>F. culmorum</i> | 20 |
| II.5.4. Génome de <i>F. culmorum</i> | 21 |
| II.5.5. Diversité génétique des populations de <i>F. culmorum</i> | 21 |
| II.6. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA PATHOGENICITÉ | 22 |
| II.7. ÉPIDEMIOLOGIE DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ..... | 23 |
| II.8. FACTEURS FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ | 24 |
| II.9. LUTTE CONTRE LA POURRITURE DU COLLET ET LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ..... | 25 |
| II.9.1. Lutte culturale | 25 |
| II.9.2. Lutte chimique..... | 26 |
| II.9.3. Lutte biologique | 26 |
| II.9.4. Sélection variétale | 27 |
| II.9.5. Lutte intégrée..... | 27 |
| III. MATÉRIEL ET MÉTHODES | 29 |
| III.1. IDENTIFICATION DES AGENTS RESPONSABLES DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ EN ALGÉRIE | 29 |
| III.1.1. Collecte des échantillons..... | 29 |
| III.1.2. Isolement, purification par culture monospore et conservation..... | 29 |
| III.1.3. Identification morphologique des isolats | 31 |
| III.1.4. Identification moléculaire des isolats..... | 31 |
| III.1.4.1. Identification moléculaire des isolats de <i>Fusarium</i> spp. par séquençage du gène <i>TEFI- α</i> | 32 |
| III.1.4.2. Identification moléculaire des isolats de <i>Microdochium</i> spp. par PCR | 33 |
| III.1.5. Description morphologique des espèces identifiées | 35 |
| III.2. ÉTUDE DU POUVOIR TOXINOGENÈNE DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> | 35 |
| III.2.1. Détermination du chémotype des isolats de <i>F. culmorum</i> par ASO PCR | 35 |
| III.2.2. Détermination du potentiel toxigène des isolats de <i>F. culmorum</i> sur milieu liquide par GC-MS..... | 36 |
| III.2.3. Détermination du potentiel toxigène des isolats de <i>F. culmorum</i> sur graines de riz par GC-MS..... | 37 |
| III.3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> | 37 |
| III.3.1. Détermination du type sexuel des isolats de <i>F. culmorum</i> | 37 |

| | |
|---|-----------|
| III.3.2. Étude de la diversité génétique des isolats de <i>F. culmorum</i> par les marqueurs SSR..... | 38 |
| III.3.3. Analyse des données des SSR..... | 40 |
| III.4. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> | 42 |
| III.5. ÉTUDE DE L'AGRESSIVITÉ DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> SUR COLLET ET ÉPI DU BLÉ..... | 42 |
| III.5.1. Évaluation de l'agressivité des isolats de <i>F. culmorum</i> sur collet..... | 42 |
| III.5.2. Évaluation de l'agressivité des isolats de <i>F. culmorum</i> sur épi..... | 43 |
| IV. RÉSULTATS..... | 47 |
| IV.1. IDENTIFICATION DES AGENTS RESPONSABLES DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ EN ALGÉRIE..... | 47 |
| IV.1.1. Collecte des échantillons..... | 47 |
| IV.1.2. Isolements, purification par monospore et conservation..... | 47 |
| IV.1.3. Identification morphologique des isolats..... | 49 |
| IV.1.4. Identification moléculaire des isolats..... | 49 |
| IV.1.4.1. Identification moléculaire des isolats de <i>Fusarium</i> spp. par séquençage du gène <i>TEFI-α</i> | 49 |
| IV.1.4.2. Identification moléculaire de <i>Microdochium</i> spp. par PCR..... | 51 |
| IV.1.5. Description morphologique des espèces identifiées..... | 52 |
| IV.2. POUVOIR TOXINOGENÈ DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> | 61 |
| IV.2.1. Détermination du chémotype des isolats de <i>F. culmorum</i> par ASO PCR..... | 61 |
| IV.2.2. Détermination du potentiel toxigène des isolats de <i>F. culmorum</i> sur milieu liquide par GC-MS..... | 62 |
| IV.2.3. Détermination du potentiel toxigène des isolats de <i>F. culmorum</i> sur graines de riz par GC-MS..... | 65 |
| IV.3. STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> | 65 |
| IV.3.1. Détermination du type sexuel des isolats de <i>F. culmorum</i> | 65 |
| IV.3.2. Diversité génétique des isolats de <i>F. culmorum</i> par les marqueurs SSR..... | 66 |
| IV.4. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> | 74 |
| IV.5. AGRESSIVITÉ DES ISOLATS DE <i>F. CULMORUM</i> SUR COLLET ET ÉPI DU BLÉ..... | 76 |
| IV.5.1. Agressivité des isolats de <i>F. culmorum</i> sur collet..... | 76 |
| IV.5.2. Agressivité des isolats de <i>F. culmorum</i> sur épi..... | 78 |
| V. DISCUSSION..... | 85 |
| VI. CONCLUSION..... | 96 |

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 97
ANNEXE 124
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 165

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|-------------------|--|------------------------------------|
| Tableau 1 | Les mycotoxines produites par les espèces de <i>Fusarium</i> | 14 |
| Tableau 2 | Les concentrations maximales autorisées de certaines fusariotoxines dans les produits alimentaires dans l'UE. | 19 |
| Tableau 3 | Les amorces utilisées pour l'identification des isolats de <i>Fusarium</i> spp. | 33 |
| Tableau 4 | Les couples d'amorces des deux espèces <i>M. nivale</i> et <i>M. majus</i> | 35 |
| Tableau 5 | Les couples d'amorces utilisés pour la détermination des chémotypes. | 36 |
| Tableau 6 | Les couples d'amorces utilisés pour la détermination des mating types. | 38 |
| Tableau 7 | Les marqueurs SSR utilisés pour l'étude de la diversité génétique de <i>F. culmorum</i> | 40 |
| Tableau 8 | Échelle de notation des symptômes sur épi | 46 |
| Tableau 9 | Les espèces de <i>Fusarium</i> identifiées à partir du collet et de l'épi. | 51 |
| Tableau 10 | AMOVA des populations de <i>F. culmorum</i> d'Algérie, d'Australie, d'Italie et des États-Unis. | 67 |
| Tableau 11 | Estimations de la différenciation génétique (ϕ_{PT} , en dessous de la diagonale) et du nombre efficace de migrants (N_m , au dessus de la diagonale) entre les paires de populations de <i>F. culmorum</i> des quatre pays. | 68 |
| Tableau 12 | Fréquences des chémotypes, des mating types et les indices de la diversité génétique des populations de <i>F. culmorum</i> des quatre pays. | 68 |
| Tableau 13 | Assignation des isolats de <i>F. culmorum</i> aux populations CU1 ou CU2 par l'utilisation des 9 marqueurs SSR. | Erreur ! Signet non défini. |
| Tableau 14 | AMOVA des clusters de <i>F. culmorum</i> CU1 et CU2 déterminés par le logiciel STRUCTURE. | 70 |
| Tableau 15 | Fréquences des chémotypes, des mating types et les indices de la diversité génétique des clusters CU1 et CU2 de <i>F. culmorum</i> déterminés par le logiciel STRUCTURE. | 71 |
| Tableau 16 | AMOVA de la population algérienne de <i>F. culmorum</i> (CU1 et CU2). | 73 |
| Tableau 17 | Estimations de la différenciation génétique (ϕ_{PT} , en dessous de la diagonale) et du nombre efficace de migrants (N_m , au dessus de la diagonale) entre les deux populations génétiques définies au sein de la population algérienne de <i>F. culmorum</i> | 73 |
| Tableau 18 | Fréquences des chémotypes, des mating types et les indices de la diversité génétique des clusters CU1 et CU2 de la population algérienne de <i>F. culmorum</i> déterminés par le logiciel STRUCTURE. | 73 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|------------------|---|----|
| Figure 1 | Symptômes de la pourriture du collet du blé. | 9 |
| Figure 2 | Symptômes de la fusariose de l'épi sur blé. | 9 |
| Figure 3 | Diagramme représentant la phylogénie de <i>Fusarium</i> basé sur le séquençage des marqueurs <i>RPB1</i> et <i>RPB2</i> | 11 |
| Figure 4 | Les différents types de trichothécènes. | 15 |
| Figure 5 | Étapes de la biosynthèse des trichothécènes. | 17 |
| Figure 6 | Représentation schématique du cluster <i>Tri5</i> et des trois loci regroupant les gènes <i>Tri</i> chez <i>F. graminearum</i> | 18 |
| Figure 7 | Localisation des différents gènes (☆☆☆☆) associés à l'agressivité sur les chromosomes de <i>F. graminearum</i> | 23 |
| Figure 8 | Wilayas prospectées en 2014 et en 2015 (en vert). | 30 |
| Figure 9 | Capture de l'interface web de <i>Fusarium MLST</i> | 34 |
| Figure 10 | Capture de l'interface web de Blast de NCBI. | 34 |
| Figure 11 | Essai <i>in situ</i> | 45 |
| Figure 12 | Symptômes de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé observés lors des prospections. | 48 |
| Figure 13 | Répartition géographique de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé en Algérie. | 49 |
| Figure 14 | Résultat du BLASTn de l'isolat IL 291 dans GenBank de NCBI. | 50 |
| Figure 15 | Alignement de la séquence de l'isolat IL 291 (Query) avec la séquence de la souche MG195126.1. | 50 |
| Figure 16 | Profil de migration des produits d'amplification sur gel d'agarose. | 51 |
| Figure 17 | Aspect cultural des espèces identifiées sur milieu PDA. | 55 |
| Figure 18 | Aspect cultural des espèces identifiées sur milieu PDA. | 56 |
| Figure 19 | Aspect cultural et microscopique de <i>M. nivale</i> et de <i>M. majus</i> | 57 |
| Figure 20 | Aspect des sporodochies produites sur milieux PDA et CLA. | 57 |
| Figure 21 | Aspect microscopique des espèces identifiées sur milieux SNA et CLA (Gx400). | 58 |
| Figure 22 | Aspect microscopique des espèces identifiées sur milieux SNA et CLA. | 59 |
| Figure 23 | Aspect microscopique des espèces identifiées sur milieux SNA et CLA. | 60 |
| Figure 24 | Profil de migration sur gel d'agarose des produits de l'amplification par les amorces spécifiques du gène <i>Tri3</i> | 61 |
| Figure 25 | Profil de migration sur gel d'agarose des produits de l'amplification par les amorces spécifiques du gène <i>Tri12</i> | 62 |
| Figure 26 | Concentrations de la culmorine et du 3ADON produites par les isolats de <i>F. culmorum</i> dans le milieu d'agmatine. | 63 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figure 27 | Profil de migration sur gel d'agarose après amplification par les amorces CUL-1 et CUL-2. | 66 |
| Figure 28 | Localisation des 10 marqueurs SSR, du gène <i>MAT1-2</i> et du gène <i>Tri5</i> sur le génome de la souche UK99 de <i>F. culmorum</i> | 66 |
| Figure 29 | Représentation de la distribution du log vraisemblance avec $K = 8$ | 69 |
| Figure 30 | Structure génétique de la population de <i>F. culmorum</i> basée sur les données des 9 marqueurs SSR et déterminée par le logiciel STRUCTURE avec $K = 2$ | 70 |
| Figure 31 | Distribution des chémotypes, des mating types et des clusters de <i>F. culmorum</i> dans les quatre pays (Algérie, Australie, Italie et les États-Unis). | 71 |
| Figure 32 | Indices d'association obtenus par le logiciel R package <i>poppr</i> pour les deux clusters CU1 et CU2. | 72 |
| Figure 33 | Indices d'association obtenus par le logiciel R package <i>poppr</i> entre les paires de loci SSR pour les deux clusters CU1 et CU2. | 72 |
| Figure 34 | Croissance mycélienne de quelques isolats de <i>F. culmorum</i> (IL 193, IL 224, IL 190, IL 291, IL 403, IL 279) après 4 jours d'incubation à 10, 15, 20, 25 et 30°C. | 75 |
| Figure 35 | Comparaison entre les collets des plantules inoculées par les isolats de <i>F. culmorum</i> et témoins. | 77 |
| Figure 36 | Symptômes de la fusariose de l'épi observés sur la variété HD 1220 suite à une inoculation par les isolats de l'espèce <i>F. culmorum</i> | 78 |
| Figure 37 | Symptômes de la fusariose de l'épi observés sur la variété Vitron suite à une inoculation par les isolats de l'espèce <i>F. culmorum</i> | 79 |
| Figure 38 | Comparaison entre les microparcelles témoins et inoculées. | 80 |
| Figure 39 | Comparaison entre des épis témoins et inoculés de la variété HD 1220. | 80 |
| Figure 40 | Comparaison entre des épis témoins et inoculés de la variété Vitron. | 81 |
| Figure 41 | Échelle des degrés d'attaques observés sur les épis de la variété Vitron. | 82 |
| Figure 42 | Échelle des degrés d'attaques observés sur les épis de la variété HD 1220. | 82 |
| Figure 43 | Sévérité de la maladie évaluée 21 jours après l'inoculation des épis par les isolats de <i>F. culmorum</i> | 83 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

15ADON: 15-acetyldéoxynivalénol
3ADON: 3-acetyldéoxynivalénol
ABI: Applied Biosystems
ADN: Acide désoxyribonucléique
AFLP: Amplified fragment length polymorphism
ARN: Acide ribonucléique
ARS-USDA: Agricultural Research Service- United States Department of Agriculture
ASO PCR: Allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction
BLAST: Basic local alignment search tool
BLASTn: Basic local alignment search tool nucleotide
CA: Carrot agar
CID: Contraste interférentiel différentiel
CLA: Carnation leaf agar
CTAB: Cetyl trimethylammonium bromide
dNTP: Désoxyribonucléoside triphosphate
ddNTP: Didésoxyribonucléoside triphosphate
DON: Déoxynivalénol
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
ENSA: École Nationale Supérieure Agronomique
FB1: Fumonisine type B1
FB2: Fumonisine type B2
FB3: Fumonisine type B3
FCR: Fusarium crown rot
FHB: Fusarium head blight
Fig.: Figure
FRR: Fusarium root rot
FX: Fusarénone-X
GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry
HMG: High mobility group
HP-LC: High pressure-liquid chromatography
HT-2: Toxine HT-2

IGS: Intergenic spacer
IM: Indice de la maladie
ISSR: Inter simple sequence repeat
ITGC: Institut Technique des Grandes Cultures
ITS: Internal transcribed spacer
LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometry
MAT: Mating type
MCMC: Markov Chain Monte Carlo
Mb: Mégabases
MLST: Multilocus sequence typing
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NIV: Nivalénol
NRRL: Northern Regional Research Laboratory
ORF: Open reading frame
pb: Paire de bases
PCR: Polymerase chain reaction
PDA: Potato dextrose agar
Ph: Phase contrast microscopy
PMG: Poids de mille grains
QTL: Quantitative trait loci
RAPD: Random amplified polymorphic DNA
Rep-PCR: Repetitive extragenic palindromic-Polymerase chain reaction
RFLP: Restriction fragment length polymorphism
RPB1: RNA polymerase I large subunit 1
RPB2: RNA polymerase II large subunit 1
rpm: Rotation par minute
SAU: Surface Agricole Utile
SCAR: Sequence characterized amplified regions
SNA: Spezieller nährstoffarmer agar
SNP: Single nucleotide polymorphism
SSR: Simple sequence repeat
T-2: Toxine T2

TAE: Tris, Acétate, EDTA

TCTA: Trichothécène de type A

TCTB: Trichothécène de type B

TEF1- α : Translation elongation factor-alpha

UE: Union Européenne

USA: United States of America

UV: Ultraviolet

YMB: Yeast malt broth

Introduction

I. INTRODUCTION

D'un point de vue économique et en tant que denrée alimentaire de base pour l'homme, le blé est considéré comme l'une des cultures céréalières stratégiques dans le monde. En Algérie, la culture du blé revêt une importance majeure par les superficies qu'elle occupe. En dépit d'une demande accrue en blé qui représente une composante majeure dans l'alimentation humaine et animale, l'Algérie enregistre un déficit de production. Celui-ci est comblé chaque année par des importations afin de couvrir les besoins nationaux de consommation. En 2016, l'Algérie s'est classée au troisième rang des pays importateurs de blé dans le monde avec une facture de 1,7 milliards de dollars américains (Anonyme, 2016 ; www.statista.com).

Les stress biotiques constituent l'un des facteurs limitant de la culture du blé en Algérie. En effet, les maladies et les ravageurs entraînent chaque année des pertes économiques importantes (Aouali et Douici-Khalfi, 2009). En Algérie, la fusariose de l'épi et la pourriture du collet sont fréquemment rencontrées dans les zones de culture du blé (Yekkour *et al.*, 2015 ; Touati-Hattab *et al.*, 2016). Ces deux affections sont connues comme étant les plus destructrices dans les zones de production du blé à travers le monde (Moya-Elizondo, 2013 ; Ferrigo *et al.*, 2016). L'importance économique de ces affections est attribuée d'une part aux pertes sur les rendements qui sont dues à l'avortement des fleurs et à la diminution du nombre et du poids des grains récoltés, et d'autre part à la dégradation de la qualité des grains par les mycotoxines (Scherf *et al.*, 2013 ; Gilbert et Habert, 2013).

La fusariose de l'épi et la pourriture du collet sont causées par des espèces appartenant à différents genres pouvant agir seules ou en association synergique. Les principaux agents causaux de ces deux affections appartiennent au genre *Fusarium*. Les espèces fusariennes, contrairement aux autres, produisent des mycotoxines appartenant à plusieurs familles chimiques. Parmi ces mycotoxines, les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone sont les plus préoccupantes à cause de leur toxicité pour l'homme, les animaux et les plantes hôtes (Ferrigo *et al.*, 2016). Ces mycotoxines s'accumulent généralement pendant la croissance des grains et occasionnellement durant leur stockage. Chaque espèce de *Fusarium* présente son propre spectre de mycotoxines. Par ailleurs, des différences sont souvent observées au sein de la même espèce définissant ainsi différents chémotypes. Souvent, ces mycotoxines coexistent entre-elles dans le tissu infecté où une accumulation de plusieurs toxines produites par la même espèce peut avoir lieu (Charmet *et al.*, 2016 ; Ferrigo *et al.*, 2016).

Parmi les espèces impliquées dans la pourriture du collet et dans la fusariose de l'épi du blé, *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. est actuellement considérée comme l'espèce la plus répandue dans plusieurs pays du globe (Tunisie, Algérie, sud de l'Italie, Iran, Irak, etc.) (Pouzeshimiab *et al.*, 2014 ; Rebib *et al.*, 2014 ; Balmas *et al.*, 2015 ; Yekkour *et al.*, 2015 ; Matny *et al.*, 2017). Cette espèce a été aussi fréquemment isolée en Angleterre, aux États-Unis et en Europe (Parry *et al.*, 1995 ; Smiley *et al.*, 2005 ; Giraud *et al.*, 2010). Le téléomorphe de cette espèce n'a pas encore été observé. Deux types sexuels *MATI-1* et *MATI-2* ont été cependant identifiés chez plusieurs populations de cette espèce (Obanor *et al.*, 2010). Les principales mycotoxines produites par cette espèce sont le déoxynivalénol et sa forme acétylée le 3-acetyldéoxynivalénol, le nivalénol et la zéaralénone (Wagacha et Muthomi, 2007 ; Kotowicz *et al.*, 2014).

Peu de recherches se sont intéressées à l'espèce *F. culmorum* par rapport à *F. graminearum* Schwabe. L'effet de la température sur la croissance mycélienne, sur l'agressivité et sur l'accumulation des mycotoxines des isolats de *F. culmorum* a été très peu étudié (Hope et Magan, 2003 ; Brennan *et al.*, 2005). Cependant, l'agressivité de quelques isolats de *F. culmorum* obtenus à partir du collet ou de l'épi de blé a été évaluée sur collet ou sur épi (Brennan *et al.*, 2003 ; Smiley *et al.*, 2005 ; Kammoun-Gargouri, 2010). Par ailleurs, de nombreux marqueurs moléculaires ont été utilisés pour étudier la variabilité génétique de quelques collections de *F. culmorum*, néanmoins, la plupart d'entre eux n'ont pas été suffisamment polymorphes ou ont exhibé un problème de séquences homologues (O'Donnell et Cigelnik, 1997 ; Nayaka *et al.*, 2011).

En Algérie, très peu de travaux ont été réalisés sur la pourriture du collet et la fusariose de l'épi du blé (Yekkour *et al.*, 2015 ; Touati-Hattab *et al.*, 2016). Des prospections effectuées dans quelques régions céréalières durant la dernière décennie ont cependant signalé la présence de ces deux affections en Algérie. Des données fragmentaires d'une enquête menée par l'ITGC ont aussi révélé la présence de la fusariose de l'épi dans de nombreuses régions productrices de blé en Algérie durant la campagne 2011-2012. Les résultats de cette enquête montrent que cette maladie s'étend de l'est à l'ouest du pays avec des degrés de prévalence variant de 19% à 91% (Ghalem-Djender *et al.*, 2013). Les présents travaux ont été menés suite au développement spectaculaire de la fusariose de l'épi du blé durant ces dernières années et la signalisation de la pourriture du collet dans plusieurs régions du pays.

Le premier objectif de cette étude a porté sur l'identification des espèces fongiques associées à la pourriture du collet et à la fusariose de l'épi du blé en Algérie. Pour cela, des prospections ont été réali-

sées dans toutes les régions céréalières durant les deux campagnes agricoles 2013-2014 et 2014-2015. Les isolats obtenus à partir du collet et de l'épi du blé ont été morphologiquement identifiés dans un premier temps suivant les critères donnés par Nelson *et al.* (1983), Samuel et Hallet (1983), Leslie et Summerell (2006) et Hoshino *et al.* (2009). Cette identification morphologique ne nous a pas permis de différencier les espèces en question et de ce fait, elle a été complétée par une PCR classique utilisant des amorces spécifiques ou un séquençage d'une portion du gène *TEF1- α* .

Les résultats de plusieurs travaux ont montré que *F. culmorum* est l'espèce causale de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé la plus prévalente en Algérie (Yekkour *et al.*, 2015). Etant donné le déficit en données relatives aux populations de cette espèce et son occurrence en Algérie et dans d'autres pays, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de ses populations qui est une donnée essentielle pour l'élaboration d'une stratégie de lutte efficace contre la pourriture du collet et la fusariose de l'épi. Dans ce sens, les chémotypes des isolats de cette espèce ont été déterminés par ASO PCR en employant des amorces spécifiques. Afin de confirmer les résultats obtenus par l'ASO PCR et de quantifier les toxines produites, une analyse par GC-MS a été réalisée à partir de cultures de ces isolats sur milieu liquide et sur graines de riz. Les isolats de *F. culmorum* ont également fait l'objet d'une autre caractérisation portant sur la détermination de leur type sexuel par PCR. Par ailleurs une analyse de la diversité génétique des isolats de *F. culmorum* par l'utilisation de marqueurs SSR a été menée. Ces derniers ont été sélectionnés en raison de leur codominance, de leur reproductibilité ainsi que de leur polymorphisme. La structure génétique de la population algérienne de *F. culmorum* a été comparée à trois autres populations de la même espèce originaires de trois pays (Italie, Australie et États-Unis). La diversité génétique de ces trois populations a été étudiée en utilisant la même série de marqueurs SSR. Les chémotypes et les types sexuels de ces trois populations ont été également déterminés au moyen des mêmes techniques précédemment utilisées pour l'étude de la population algérienne.

Afin de déterminer l'optimum thermique de la croissance mycélienne des isolats algériens de *F. culmorum* et d'évaluer une éventuelle distribution géographique ou génétique de ces derniers en fonction de leurs optima thermiques, une étude de l'effet *in vitro* de la température sur leur croissance mycélienne a été conduite. Une évaluation de l'agressivité des isolats obtenus à partir du collet et de l'épi du blé a été aussi menée sur collet de blé *in vivo* et sur épi *in situ*. Des inoculations croisées des isolats obtenus à partir du collet et de l'épi ont été respectivement réalisées sur épi et sur collet. Ces inoculations ont été effectuées sur les deux variétés de blé les plus cultivées en Algérie (HD 1220 et Vitron)

Synthèse bibliographique

II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. LA CULTURE DU BLÉ

Le blé (*Triticum* spp.) est un membre de la famille des *Poaceae*. Il représente l'une des premières cultures domestiquées par l'homme. Son origine se situe dans la zone du croissant fertile qui regroupe actuellement la Palestine, la Jordanie, la Syrie, le Liban, le sud-est de la Turquie, le nord et l'est de l'Irak et le bord ouest de l'Iran. C'est à partir de cette zone que les blés ont été dispersés vers l'Afrique, l'Asie et l'Europe (Boulal *et al.*, 2007).

II.1.1. Importance de la culture du blé

Le blé est l'une des céréales les plus importantes au niveau mondial avec le maïs et le riz. Son importance réside dans la possibilité de sa transformation en farine et en semoule. Il est essentiellement utilisé pour l'alimentation humaine et à un moindre degré pour l'alimentation animale et l'industrie (biocarburants).

II.1.1.1. Importance de la culture du blé dans le monde

La production mondiale de blé a été estimée, en 2016, à plus de 733 millions de tonnes et elle devra atteindre 760,2 millions de tonnes en 2017 (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>). La Chine, l'Inde, la Fédération de Russie, les États-Unis, la France, le Canada, l'Allemagne, le Pakistan, l'Australie et l'Ukraine représentent les dix premiers pays producteurs du blé dans le monde (Annexe 1) (<http://www.fao.org/faostat/>).

II.1.1.2. Importance de la culture du blé en Algérie

En Algérie, la culture du blé occupe une place privilégiée par l'importance des superficies qui s'étendent sur 1,65 millions d'hectares ce qui représente environ 60% de la SAU. Cette culture a connu des fluctuations importantes au cours de la dernière décennie du point de vue des rendements, de la production et même des superficies cultivées. Malgré l'importance de ces dernières, la production nationale a connu une forte baisse depuis l'année 2013 à cause des aléas climatiques notamment la sécheresse. Elle est passée de 3,2 millions de tonnes en 2013 à 2,4 millions de tonnes en 2014 avec un rendement moyen d'environ 14 q/ha (Annexe 1) (<http://www.fao.org/faostat/>).

II.1.2. Les contraintes biotiques et abiotiques de la culture du blé

Bien que les systèmes de la culture du blé soient bien développés, les stress abiotiques et biotiques ont tendance à réduire les rendements (William *et al.*, 2011). Les maladies causées par les agents pathogènes sont considérées comme les principales contraintes biotiques pour la production du blé. L'émergence de nouvelles maladies dévastatrices comme le "Wheat blast", la rouille noire race TTKSF et la rouille jaune race TTTTF constitue actuellement la principale menace de la culture du blé (Singh *et al.*, 2011a ; Pretorius *et al.*, 2012 ; Castroagudín *et al.*, 2016 ; Abu Sadat et Choi, 2017). En plus des maladies, cette culture est également soumise aux aléas climatiques qui entraînent chaque année d'importantes diminutions de la production.

La faiblesse des rendements du blé en Algérie est due à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques. Les contraintes d'ordre abiotique sont principalement la sécheresse et les pratiques culturales appliquées comme, par exemple, l'utilisation de variétés anciennes à faible rendement (Hamadache *et al.*, 2002). Les contraintes d'ordre biotique sont dues aux attaques de divers ravageurs (insectes, oiseaux et rongeurs), aux adventices et aux pathogènes (nématodes, bactéries, virus et champignons) (Hamadache, 2013). Les infections du feuillage, des racines et des épis provoquent d'importantes pertes sur les rendements. Les maladies fongiques les plus redoutées en Algérie sont la rouille jaune (*Puccinia striiformis* Westend.), la rouille brune (*P. recondita* Roberge ex Desm.), la tache septorienne [*Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desm.) Quaedvl. & Crous], la tache auréolée [*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler], la pourriture du collet et la fusariose de l'épi (Aouali et Douici-Khalfi, 2009 ; Benslimane *et al.*, 2011 ; Meamiche-Neddaf *et al.*, 2017). Ces deux dernières sont considérées comme les plus destructives dans plusieurs régions du pays (Ghalem-Djender *et al.*, 2013 ; Yekkour *et al.*, 2015).

II.2. LA POURRITURE DU COLLET ET LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ

La pourriture du collet et la fusariose de l'épi sont des maladies fongiques qui se développent sur plusieurs céréales (blé, maïs, orge, avoine et riz) (Scherm *et al.*, 2013 ; Dweba *et al.*, 2017). Les agents causaux de ces maladies peuvent affecter divers organes (semences, racines, collets et épis) à différents stades de développement de la plante. C'est ainsi que l'on distingue différentes pathologies: fusariose de l'épi ["*Fusarium head blight* (FHB)"], pourriture racinaire appelée également pourriture du collet ["*Fusarium root rot* (FRR)", "*Fusarium crown rot* (FCR)"], fonte des semis ("Damping off") et brûlure des plantules ("Seedling blight") (Parry *et al.*, 1995 ; Scherm *et al.*, 2013).

II.2.1. Importance économique de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi

Les pertes annuelles causées par la pourriture du collet ont été estimées en Australie à 79 millions de dollars australiens (Murray et Bernan, 2009). En Tunisie, les pertes sur les rendements engendrées par cette maladie sur blé dur ont dépassé 29% (Chekali *et al.*, 2013). Aux États-Unis, cette maladie a entraîné des pertes sur les rendements allant jusqu'à 35% (Smiley *et al.*, 2005). En Iran, les pertes sur les rendements ont varié de 18 à 44% durant la période 1999-2004 (Saremi *et al.*, 2007).

La fusariose de l'épi entraîne une forte diminution des rendements et altère la qualité des grains par la présence des mycotoxines (Gilbert et Haber, 2013). Aux États-Unis, les pertes liées à cette maladie ont été estimées durant la période 1998-2000 à 2,7 milliards de dollars dans les états du centre et du nord (Nganje *et al.*, 2004). En Europe, les épidémies de la fusariose de l'épi ont occasionné des pertes variant de 10 à 30% sur les rendements (Logrieco *et al.*, 2002). En Angleterre, l'incidence de cette maladie a été estimée à 39%, de plus en 2008, 11% de la production de blé a été rejetée à cause des contaminations par les mycotoxines (Brown, 2011). En Chine, les épidémies de la fusariose de 2008, 2010 et 2012 ont entraîné des pertes importantes sur les rendements (Qiu *et al.*, 2014).

II.2.2. Agents responsables de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi

L'étiologie de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi est très complexe en raison de l'implication de plusieurs espèces fongiques appartenant à différents genres, principalement *Fusarium*, *Microdochium* et *Bipolaris*.

Les agents de la pourriture du collet les plus fréquemment rencontrés sont: *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *F. pseudograminearum* O'Donnell & Aoki et *F. graminearum* Schwabe *sensu stricto* (Moya-Elizondo, 2013). D'autres agents comme *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, *M. majus* (Wollenw.) Glynn & S.G. Edwards, *M. nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn AG-8 et plusieurs oomycètes appartenant au genre *Pythium* (*P. aristosporum* Vanterp., *P. heterothallicum* W.A. Campb. & F.F. Hendrix) sont également impliqués dans la pourriture racinaire (Dewan et Sivasithamparam, 1988 ; Glynn *et al.*, 2005 ; Acharya *et al.*, 2011 ; Ünal et Sara Dolar, 2012).

La fusariose de l'épi est causée par une vingtaine d'espèces appartenant au genre *Fusarium*. Les espèces fusariennes les plus fréquemment rencontrées à l'échelle mondiale sont: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw. et *F. pseudograminearum* (Parry *et al.*, 1995 ; Pancaldi *et al.*, 2010 ; Vaughan *et al.*, 2016). D'autres espèces fusariennes ont été récemment décrites

comme par exemple *F. praegraminearum* Gräfenhan & O'Donnell qui induit la fusariose de l'épi du blé (Gräfenhan *et al.*, 2016). Deux espèces appartenant au genre *Microdochium* (*M. majus* et *M. nivale*) ont été également signalées comme responsables de la fusariose de l'épi dans plusieurs pays (Glynn *et al.*, 2005).

II.2.3. Distribution des agents responsables de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi

La distribution géographique et la fréquence des espèces de *Fusarium* responsables de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé sont en relation directe avec la plante hôte et les conditions climatiques en particulier la température et l'humidité (Xu, 2003 ; Van der Lee *et al.*, 2015). Cependant, cette distribution géographique est devenue moins déterminante en raison de l'adaptation des espèces de *Fusarium* aux différentes conditions climatiques. C'est ainsi que l'espèce *F. culmorum* qui était la plus prédominante dans le nord, le centre et le sud de l'Europe a été progressivement remplacée par *F. graminearum* qui est devenue l'espèce la plus fréquemment isolée dans ces zones. Ceci peut être expliqué par la rotation maïs/blé adoptée comme une nouvelle pratique culturale, par l'adaptation graduelle de *F. graminearum* au climat froid grâce à la plasticité de son génome et/ou par l'augmentation des moyennes des températures en raison des changements climatiques. En outre, *F. culmorum* qui était l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les régions froides s'est actuellement adaptée dans les pays du bassin méditerranéen et dans d'autres zones à climat doux. Ce phénomène suit le principe de la dynamique des populations (Scherm *et al.*, 2013).

II.2.4. Distribution de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi

La pourriture du collet est favorisée par les climats secs et chauds (Moya-Elizondo, 2013). Elle a été signalée pour la première fois en Australie en 1951. Actuellement, elle est présente en Australie, en Asie (Syrie, Iran et Irak), en Europe, en Afrique du Nord, aux États-Unis et au Chili (Tunali *et al.*, 2006 ; EL-Khalifeh *et al.*, 2009 ; Pancaldi *et al.*, 2010 ; Rebib *et al.*, 2014 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014 ; Moya-Elizondo *et al.*, 2015 ; Yekkour *et al.*, 2015 ; Matny *et al.*, 2017). Cette maladie peut affecter les plantes de blé à n'importe quel stade de leur développement (Moya-Elizondo, 2013).

La fusariose de l'épi est largement répandue dans les régions à climat humide et subhumide. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1884 en Angleterre (Goswami et Kistler, 2004). Depuis, elle a envahi les cultures céréalières de l'Asie, de l'Europe, du Canada, des États-Unis et de l'Amérique latine (Gilbert et Haber, 2013 ; Abedi-Tizaki *et al.*, 2017 ; Wang et Cheng, 2017). Elle a été récemment signa-

lée en Afrique du Nord (Kammoun-Gargouri *et al.*, 2009 ; Touati-Hattab *et al.*, 2016). Le développement de la fusariose de l'épi dépend des conditions climatiques; les fortes humidités accompagnées par des températures douces favorisent les infections. De fortes attaques sont enregistrées lorsqu'un temps doux et pluvieux coïncide avec la floraison d'un hôte sensible et en présence d'isolats agressifs (Xu et Nicholson, 2009 ; Kuo *et al.*, 2014).

II.2.5. Symptômes de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi

Les attaques causées par les espèces de *Fusarium* sur blé sont variables selon le stade de développement de la plante. Les infections peuvent engendrer une fonte de semis de pré- ou de post-émergence, une pourriture des racines et du collet et à un stade avancé du développement de la plante la fusariose de l'épi (Scherf *et al.*, 2013).

Les symptômes initiaux de la pourriture du collet consistent en un brunissement des racines et du collet accompagné de lésions nécrotiques (Fig. 1A). Par temps humide, un feutrage mycélien blanc rosé peut apparaître au niveau du collet et sur les premiers nœuds. La tige peut aussi comporter des stries brunâtres ou rougeâtres, avec une coloration brunâtre ou violacé très marquée au niveau des trois premiers nœuds (Fig. 1B). Les épis souvent desséchés prématurément ne contiennent pas de graines (Fig. 1C) (Scherf *et al.*, 2013). Par contraste aux attaques de *Fusarium* spp., *M. nivale*, *M. majus* et *B. sorokiniana* causent en plus des infections sur les feuilles de blé. Les espèces de *Microdochium* provoquent des taches chlorotiques et nécrotiques alors que *B. sorokiniana* engendre des mouchetures sur les feuilles qui se présentent sous forme de lésions marrons (Acharya *et al.*, 2011 ; Ren *et al.*, 2015).

Les symptômes de la fusariose de l'épi se manifestent par l'apparition de petites taches brunâtres sur les glumes et les rachis (Fig. 2A). À partir de ces points d'infection, il se produit une décoloration des épillets conduisant à un dessèchement partiel ou total des épis (Fig. 2B-C). Des sporodochies oranges peuvent apparaître sur les épillets (Fig. 2D). Les graines infectées sont petites, légères, ridées et présentent le plus souvent une coloration rosâtre ou brunâtre (Fig. 2E) (Kelly *et al.*, 2008 ; West *et al.*, 2012 ; Scherf *et al.*, 2013).

II.3. LE GENRE *FUSARIUM*

Les champignons appartenant au genre *Fusarium* sont très fréquemment isolés à partir du sol, des végétaux, de l'air et de l'eau. Environ 300 espèces de *Fusarium* ont été découvertes jusqu'à aujourd'hui, réparties en 20 clades et 9 lignées monotypiques (Fig. 3) (Aoki *et al.*, 2014 ; O'Donnell *et al.*, 2015).

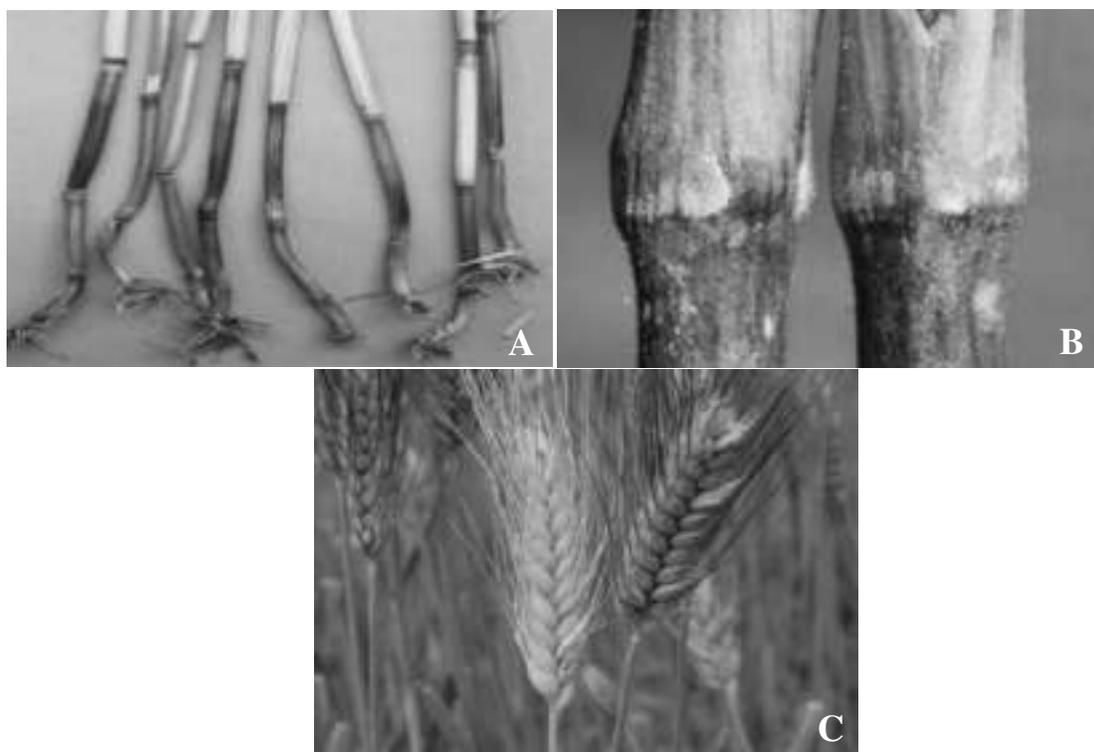


Figure 1 Symptômes de la pourriture du collet du blé. A. Brunissement du collet. B. Feutrage mycélien rosé sur les nœuds. C. Dessèchement des épis (Scherm *et al.*, 2013).

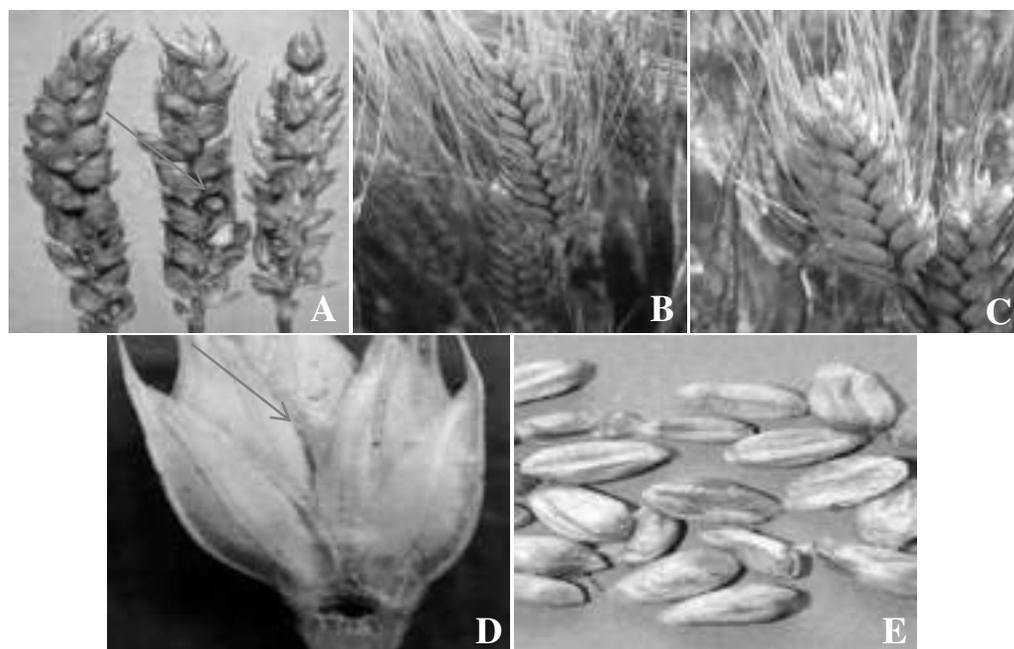


Figure 2 Symptômes de la fusariose de l'épi sur blé. A. Taches nécrotiques sur les glumes. B. Dessèchement partiel des épis. C. Dessèchement total des épis. D. Sporodochies oranges sur épillets. E. Graines de blé fusariées. A et E (Kelly *et al.*, 2008), B, C et D (Scherm *et al.*, 2013).

Leur répartition géographique est très diversifiée du fait qu'ils sont présents dans toutes les régions du monde, des zones tempérées aux régions tropicales et même désertiques (Short *et al.*, 2011 ; Sautour *et al.*, 2015). De nombreuses espèces de *Fusarium* ont été identifiées comme agents phytopathogènes de plus de 100 espèces végétales causant à l'agriculture mondiale des pertes annuelles de plusieurs milliards d'euros. Par ailleurs, plusieurs espèces du genre *Fusarium* sont connues également comme des pathogènes de l'homme et des animaux comme par exemple *F. oxysporum* E.F. Sm. & Swingle, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. dimerum* Penzig et les complexes d'espèces *F. solani* et *F. incarnatum-equiseti* qui sont considérés comme des agents opportunistes chez les patients immunodéprimés (Zhang *et al.*, 2006 ; Al-Hatmi *et al.*, 2016).

II.3.1. Taxonomie

Le genre *Fusarium* Link (du latin *Fusus* à cause des spores en forme de fuseau ou de banane) a été décrit pour la première fois en 1809 par Link (Aoki *et al.*, 2014). En 1821, Fries a décrit le genre *Gibberella* Sacc. comme téléomorphe de la majorité des espèces de *Fusarium*. Le genre *Gibberella* appartient au phylum *Ascomycota*, au sous phylum *Pezizomycotina*, à la classe *Sordariomycetes*, à l'ordre *Hypocreales* et à la famille *Nectriaceae*. Un petit nombre d'espèces de *Fusarium* ont pour téléomorphe *Calonectria*, *Nectria* ou *Albonectria*. Le téléomorphe de plusieurs espèces de *Fusarium* demeure inconnu jusqu'à présent (Leslie et Summerell, 2006 ; Aoki *et al.*, 2014).

II.3.2. Identification des espèces de *Fusarium*

L'identification des espèces appartenant au genre *Fusarium* était initialement basée sur leurs caractéristiques morphologiques et biologiques (typage sexuel). Les nouvelles techniques d'identification basées sur l'utilisation de l'outil moléculaire ont entraîné des réarrangements dans la caractérisation des espèces au sein du genre *Fusarium* (Nayaka *et al.*, 2011).

II.3.2.1. Identification morphologique des espèces de *Fusarium*

Les caractères morphologiques d'identification des espèces du genre *Fusarium* sont basés sur des critères macroscopiques et microscopiques. Parmi les critères macroscopiques on peut citer: la vitesse de croissance, la couleur et l'aspect du mycélium, la présence ou l'absence de sporodochies et de sclérotés et la pigmentation du milieu de culture. Les critères microscopiques d'identification des espèces sont: la présence ou l'absence des macroconidies et/ou des microconidies, la forme, la taille et le nombre de cloisons des conidies, la présence ou l'absence ainsi que la disposition des chlamydospores

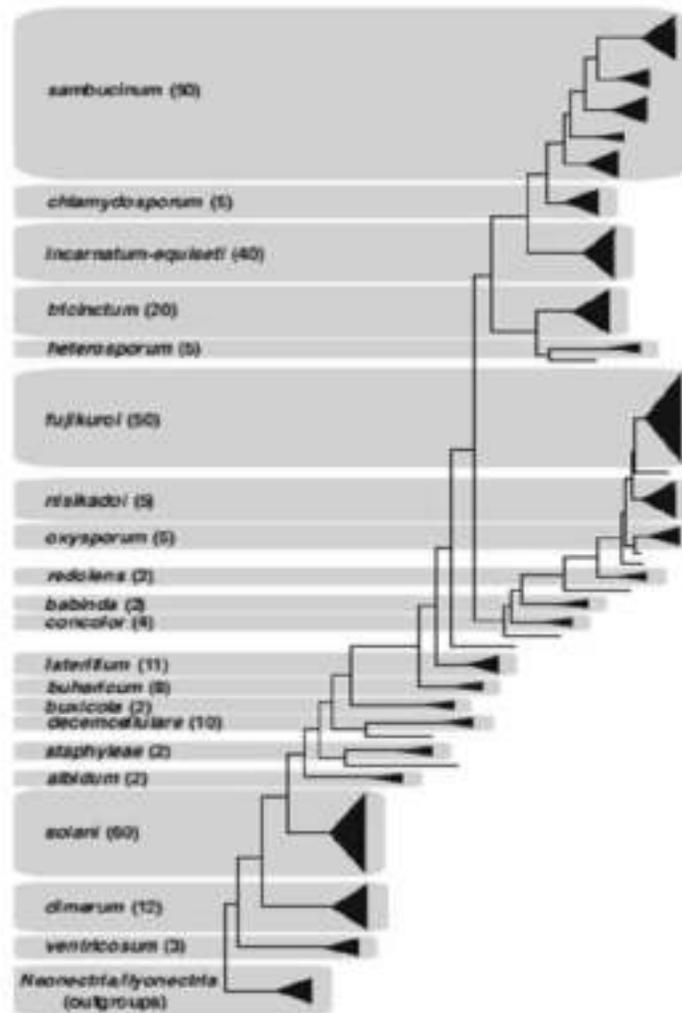


Figure 3 Diagramme représentant la phylogénie de *Fusarium* basé sur le séquençage des marqueurs *RPB1* et *RPB2* (O'Donnell *et al.*, 2015).

et la forme et la taille des phialides (Nelson *et al.*, 1983 ; Leslie et Summerell, 2006). Les macroconidies qui sont produites à partir des phialides sur des sporochies sont falciformes et présentent plusieurs cloisons transversales (1 à 9). La taille ainsi que la forme des extrémités apicales et basales des macroconidies sont des critères importants qui peuvent permettre la distinction de certaines espèces. Les microconidies qui sont généralement unicellulaires, parfois bicellulaires ont des tailles variables et se présentent sous diverses formes (ellipsoïdes, ovoïdes, piriformes ou réniformes). Elles sont solitaires, en chaînes ou groupées à l'apex des phialides. Les chlamydospores peuvent se différencier d'une manière intercalaire ou terminale sur le mycélium ou sur les macroconidies (Leslie et Summerell, 2006 ; Moretti, 2009).

La morphologie des macroconidies était le critère principal de distinction du genre *Fusarium* (Moretti, 2009). Des études phylogénétiques ont cependant montré que ce critère morphologique est soit présent

chez d'autres genres d'ascomycètes, soit il a été perdu chez certains membres du genre *Fusarium* comme par exemple, l'espèce *F. neocosmosporiellum* O'Donnell & Geiser qui était auparavant classée dans le genre *Neocosmospora* (Gräfenhan *et al.*, 2011 ; O'Donnell *et al.*, 2013). L'identification morphologique des espèces de *Fusarium* est délicate car certaines espèces présentent des caractéristiques morphologiques semblables comme par exemple *F. graminearum* et *F. pseudograminearum* alors que d'autres espèces montrent une grande diversité phénotypique. Le recours à d'autres méthodes d'identification utilisant l'outil moléculaire permet sans aucun doute de mieux caractériser les espèces de *Fusarium* (Nayaka *et al.*, 2011).

II.3.2.2. Identification biologique des espèces de *Fusarium* (Typage sexuel)

L'étude du type sexuel est exploitée pour renforcer l'identification des espèces et pour étudier la structure et la diversité génétique des populations. Le type sexuel est contrôlé par l'information génétique présente au niveau du locus *MAT* avec ses deux allèles idiomorphes *MAT1-1* et *MAT1-2*. Les analyses moléculaires ont démontré que ces allèles ne partagent aucune similitude dans les séquences d'ADN (Yun *et al.*, 2000). Chez les espèces hétérothalliques, le "mating type" est contrôlé par un seul locus avec deux allèles idiomorphes présents chez deux souches différentes dont l'une possède l'allèle *MAT1-1* et l'autre l'allèle *MAT1-2*. Ces deux allèles se distinguent l'un de l'autre par la présence chez le *MAT1-1* d'une boîte ORF présentant une boîte alpha et chez le *MAT1-2* d'une protéine de régulation, avec un domaine HMG. Chez les espèces homothalliques, les deux mating types *MAT1-1* et *MAT1-2* coexistent au sein de la même souche (Kerényi *et al.*, 2004 ; Irzykowska et Kosiada, 2011).

Les téléomorphes de certaines espèces de *Fusarium* ont été observés uniquement sur des substrats naturels alors que chez d'autres ils ont été exclusivement obtenus à partir de cultures au laboratoire. Le typage sexuel conventionnel est basé sur la confrontation de souches de la même espèce sur certains milieux de cultures (CLA, CA, etc.). Si le croisement est positif entre deux souches de la même espèce, il y aura une production de périthèces au niveau de la zone de confrontation. La fertilité du croisement peut être influencée par les conditions d'incubation et par les souches utilisées (Leslie et Summerell, 2006). Actuellement, la détermination du type sexuel des espèces de *Fusarium* hétérothalliques est réalisée au moyen d'analyses moléculaires utilisant des amorces spécifiques à chaque mating type. Plusieurs amorces ont été développées pour déterminer les mating types chez la plupart des espèces de *Fusarium* (Kerényi *et al.*, 2004).

II.3.2.3. Identification moléculaire des espèces de *Fusarium*

L'identification des espèces de *Fusarium* et de *Microdochium* utilise de plus en plus les techniques de biologie moléculaire comme la PCR et le séquençage. La PCR est basée sur l'amplification de certaines régions du génome par des amorces spécifiques à chaque espèce (Edwards *et al.*, 2002). Plusieurs couples d'amorces sont utilisés pour l'identification exacte des espèces impliquées dans la pourriture du collet et la fusariose de l'épi du blé. Ces amorces ciblent plusieurs gènes et régions conservées dont les plus importants sont le *TEF1- α* et les ITS. Le séquençage moléculaire consiste à amplifier et séquencer un gène donné et comparer ses séquences à celles disponibles dans les bases de données. La séquence partielle du gène *TEF1- α* qui code pour le facteur d'élongation de la traduction est devenue le marqueur de choix pour l'identification des espèces de *Fusarium* et de *Microdochium*. Ce gène est présent chez le genre *Fusarium* en une seule copie avec un polymorphisme de séquences élevé chez les espèces étroitement apparentées (Rahjoo *et al.*, 2008 ; O'Donnell *et al.*, 2015 ; Crous *et al.*, 2015). Les marqueurs *RPB1* et *RPB2* sont également de plus en plus utilisés. D'autres gènes tels que ceux qui codent pour la β -tubuline et la calmoduline ainsi que les ITS1, les ITS2 et les IGS ont été aussi largement utilisés (Geiser *et al.*, 2004 ; Wulff *et al.*, 2010 ; Yli-Mattila et Gagkaeva, 2010 ; Crous *et al.*, 2015).

Les bases de données FUSARIUM-ID et *Fusarium MLST* ont été récemment construites pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* en se basant sur les séquences des gènes *TEF1- α* , *RPB1*, *RPB2*, etc. (Geiser *et al.*, 2004 ; O'Donnell *et al.*, 2010 ; Park *et al.*, 2010). À côté de ces bases de données, Genbank NCBI représente l'une des bases les plus utilisées pour l'identification des espèces de *Fusarium* et de *Microdochium* (O'Donnell *et al.*, 2015 ; Crous *et al.*, 2015).

Les génomes complets de six espèces de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. verticillioïdes*, *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum*, *F. fujikuroi* Nirenberg et *F. culmorum*) ont été séquencés et publiés entre 2003 et 2016 (Cuomo *et al.*, 2007 ; Coleman *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2010 ; Wiemann *et al.*, 2013 ; Urban *et al.*, 2016). *F. graminearum* est considéré comme l'espèce modèle de la fusariose de l'épi. La publication pour la première fois du génome de la souche PH-1 de *F. graminearum* en 2003 a stimulé les recherches sur la structure de son génome et sur les interactions hôte-pathogène au niveau moléculaire (www.broad.mit.edu/annotationfungi/Fusarium). Par la suite, le génome de *F. graminearum* a été révisé et reannoté plusieurs fois (King *et al.*, 2015). La plupart des études sur *F. graminearum* se sont concentrées sur les mécanismes de la pathogénicité sur épi, très peu de travaux se sont intéressés à la pathogénicité sur collet. En contrepartie, le génome de *F. culmorum* était inconnu jusqu'en 2016. La disponibilité ac-

tuelle de son génome doit être exploitée afin de caractériser les populations de cette espèce, étudier son génome et identifier les gènes impliqués dans sa pathogénicité sur collet et sur épi.

II.4. MYCOTOXINES

Plusieurs mycotoxines appartenant à différentes familles chimiques (trichothécènes, fumonisines, zéaralénone, enniantines, beauvéricines, moniliformines et fusarines C) sont produites par diverses espèces de *Fusarium* (Tableau 1). Il est important de noter que la même toxine peut être produite par plusieurs espèces de *Fusarium* et que chaque souche peut synthétiser plusieurs toxines à la fois (Parent-Massin *et al.*, 2013). Au sein d'une même espèce, la capacité de production d'une toxine *in vitro* et *in vivo* varie en fonction de l'isolat (Yli-Mattila et Gagkaeva, 2010). Les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone représentent la préoccupation majeure de la filière céréalière en raison de leur toxicité pour l'homme et les animaux, des pertes économiques qu'elles engendrent et de leur occurrence. Elles sont les seules pour lesquelles les teneurs dans les aliments sont réglementées dans plusieurs pays. Ces mycotoxines contaminent principalement les céréales et par voie de conséquence les produits qui en dérivent (Desjardins, 2006 ; Gratz *et al.*, 2014 ; Charmet *et al.*, 2016).

Tableau 1 Les mycotoxines produites par les espèces de *Fusarium* (McCormick *et al.*, 2010 ; Kotowicz *et al.*, 2014).

| Mycotoxines | Espèces |
|-------------------------|---|
| 3-acetyldéoxynivalénol | <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. pseudograminearum</i> |
| 15-acetyldéoxynivalénol | <i>F. graminearum</i> , <i>F. pseudograminearum</i> |
| Nivalénol | <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. pseudograminearum</i> |
| Zéaralénone | <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. cerealis</i> |
| Fumonisine | <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. nygamai</i> |
| T-2, HT-2 | <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. acuminatum</i> |
| Diacétoxyscirpénol | <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. langsethiae</i> |
| Moniliformine | <i>F. subglutinans</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. oxysporum</i> , |
| Enniantine | <i>F. langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. avenaceum</i> |
| Beauvéricine | <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. avenaceum</i> |
| Culmorine | <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> |

II.4.1. Les trichothécènes

Les trichothécènes sont considérées comme les toxines les plus communes chez les espèces de *Fusarium* (Schollenberger *et al.*, 2007). Elles sont très fréquentes dans toutes les régions de production des céréales. Ce sont des composés stables d'un point de vue chimique et thermique qui ne peuvent pas être dégradés par les processus technologiques de transformation des denrées alimentaires.

II.4.1.1. Structure chimique des trichothécènes

Les trichothécènes se caractérisent par une structure sesquiterpène tricyclique avec une double liaison en position C9, 10 et une fonction époxyde en position C12, 13. Quatre types de trichothécènes ont été identifiés: A, B, C et D (Fig. 4). Les types A (TCTA) et B (TCTB) sont les seuls types produits par les espèces de *Fusarium*. Le type A possède un noyau de base qui a un hydrogène, un hydroxyle ou un groupe ester en position C8 sans substitution particulière. Les toxines T-2, HT-2, 4,15-diacétoxyscirpénol et scirpénol appartiennent au type A. Le type B qui possède une liaison cétone en position C8 est représenté par le nivalénol (NIV), la fusarénone-X (FX) et le déoxynivalénol (DON) avec ses dérivés acétylés, le 3-acetyldéoxynivalénol (3ADON) et le 15-acetyldéoxynivalénol (15ADON) (Kimura *et al.*, 2007 ; McCormick *et al.*, 2011). Au sein du type B, deux chémotypes ont été décrits: le chémotype I responsable de la production du DON et de ses deux dérivés acétylés (3ADON et 15ADON) et le chémotype II responsable de la production du NIV et/ou de FX (Goswami et Kristler, 2004 ; Pasquali et Migheli, 2014). Le déoxynivalénol et ses formes acétylées représentent les toxines les plus fréquentes à travers le monde.

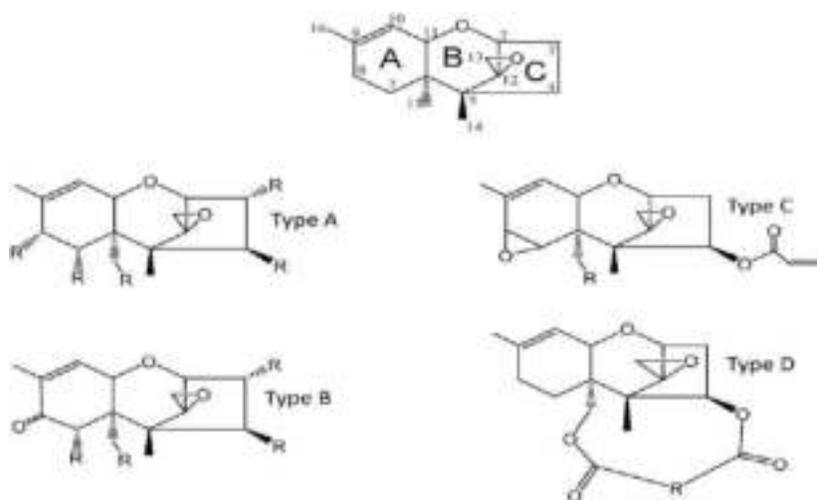


Figure 4 Les différents types de trichothécènes (McCormick *et al.*, 2011).

II.4.1.2. Biosynthèse des trichothécènes

La biosynthèse des trichothécènes chez les espèces de *Fusarium* est un processus complexe qui implique de nombreuses étapes d'oxygénation, d'isomérisation et d'estérification (Fig. 5) (McCormick *et al.*, 2011). Cette biosynthèse est contrôlée par un "cluster" de 16 gènes dénommés *Tri* localisés au niveau de 4 loci sur différents chromosomes: le premier locus regroupe 12 gènes *Tri* appelé "cluster *Tri5*", le second est composé des gènes *Tri1* et *Tri16*, le troisième comprend le gène *Tri101* et le quatrième est constitué du gène *Tri15* (Fig. 6). Ces gènes interviennent dans les différentes étapes de la biosynthèse qui commence par la cyclisation du précurseur farnésyl pyrophosphate et se termine par la formation de l'une des trichothécènes (cf. Fig. 5) (Alexander *et al.*, 2011 ; McCormick *et al.*, 2011 ; Merhej *et al.*, 2011a). Les chémotypes sont déterminés par les gènes *Tri7*, *Tri13* et *Tri8*. L'activité des gènes *Tri7* et *Tri13* détermine des isolats du chémotype NIV alors que leur non activité engendre des isolats du chémotype DON. La biosynthèse du 3ADON et 15ADON est déterminée par le gène *Tri8*. Dans le cas du chémotype 3ADON, le gène *Tri8* code pour une estérase qui catalyse la déacétylation du C15 pour former le 3ADON et dans le cas du chémotype 15ADON, elle déclenche la déacétylation du C3 pour synthétiser le 15ADON (cf. Fig. 5) (Alexander *et al.*, 2011).

II.4.1.3. Rôle des trichothécènes dans la pathogénicité

En dépit des nombreuses études sur la pathogénicité des mycotoxines, le rôle exact des trichothécènes dans les processus infectieux de *Fusarium* reste mal connu. Lors de l'interaction avec la plante, la production des TCTB par le champignon semble s'effectuer en réponse à la mise en place des mécanismes de défense de la plante (Montibus *et al.*, 2013 ; Ponts, 2015). En effet, plusieurs études ont montré que les TCTB ne jouent aucun rôle dans les premières étapes de l'infection. Néanmoins, lors de la colonisation du collet et des graines de céréales une augmentation de la production des TCTB a été enregistrée suite à l'activation des gènes impliqués dans leur synthèse (Gosman *et al.*, 2010).

Chez le blé tendre une agressivité plus importante a été observée sur épi chez les souches productrices du DON par rapport à celles non productrices. Ces dernières ont été capables d'infecter uniquement le site d'inoculation par comparaison à celles productrices du DON qui ont colonisé tous les épillets (Desjardins *et al.*, 1996 ; Proctor *et al.*, 2002). De plus, au moment de l'infection de l'épi, une forte synthèse du DON au niveau du rachis inhibe la production de la callose qui représente une barrière limitant la progression du champignon (Jansen *et al.*, 2005 ; Ilgen *et al.*, 2009). Cette toxine induit également une forte synthèse de H₂O₂ conduisant à la mort cellulaire chez la plante hôte (Audenaert

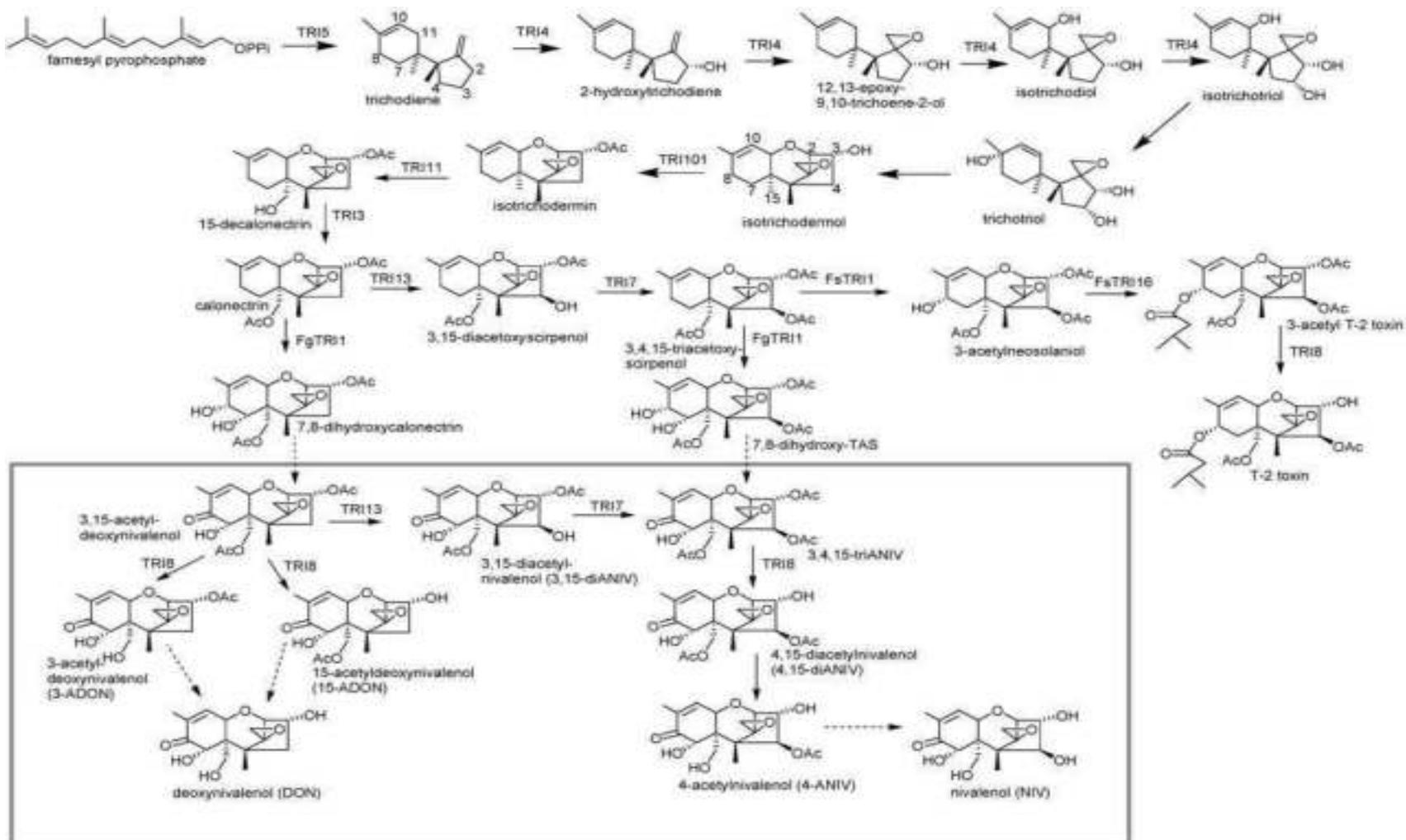


Figure 5 Étapes de la biosynthèse des trichothécènes (McCormick *et al.*, 2011).

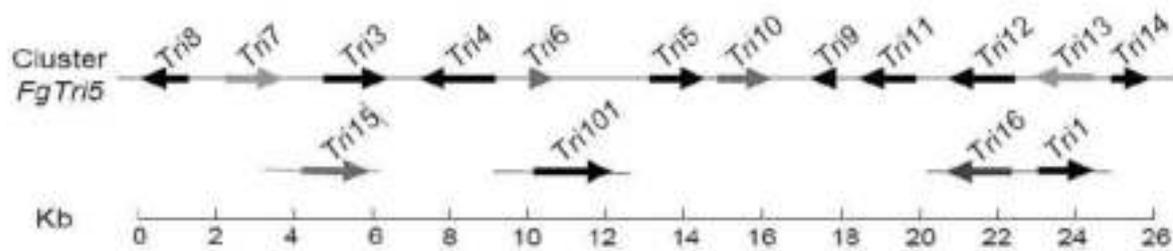


Figure 6 Représentation schématique du cluster *Tri5* et des trois loci regroupant les gènes *Tri* chez *F. graminearum*. *Tri8*: trichothécène-3-O-esterase, *Tri7*: trichothécène-4-O-acétyltransférase, *Tri3*: trichothécène-15-O-acétyltransférase, *Tri4*: trichodiène oxygénase, *Tri6*: facteur de transcription, *Tri5*: trichodiène synthase, *Tri10*: gène de régulation, *Tri9*: inconnue, *Tri11*: isotrichodermine 15-oxygénase, *Tri12*: transporteur membranaire des trichothécènes, *Tri13*: calonectrine 4-oxygénase, *Tri14*: facteur de virulence, *Tri1*: C-8 ou C-7,8 oxygénase, *Tri16*: C-8 acétyltransférase, *Tri101*: C-3 acétyltransférase, *Tri15*: gène de régulation (Merhej *et al.*, 2011a ; Alexander *et al.*, 2011).

et al., 2014). Il a été également constaté que lors de l'infection du collet, la production du DON chez *F. graminearum* et *F. culmorum* facilite la colonisation des tissus du collet (Wagacha et Muthomi, 2007 ; Gardiner *et al.*, 2009 ; Scherm *et al.*, 2011).

Des différences d'agressivité ont été observées entre des souches productrices du DON et du NIV (Covarelli *et al.*, 2014). Toutefois, il a été rapporté que le DON est plus phytotoxique que le NIV dont la toxicité se montre plus élevée chez les cellules animales (Minervini *et al.*, 2004).

II.4.2. Les fumonisines

Les fumonisines (FUM) représentent un groupe de mycotoxines associé principalement au maïs, cependant leur présence a été également signalée sur d'autres cultures (Scott, 2012). Leur structure chimique relativement simple comporte uniquement une chaîne aminopolyhydroxyalkyle de 20 carbones diestérifiée. Jusqu'à présent 28 fumonisines ont été identifiées et classées selon leur structure chimique en 4 groupes: A, B, C et P. Les fumonisines les plus communes identifiées sur les céréales sont: FB1, FB2 et FB3 (Yazar et Omurtag, 2008 ; Kotowicz *et al.*, 2014).

II.4.3. La zéaralénone

La zéaralénone (ZEN) est une toxine très commune qui est le plus souvent isolée à partir du maïs ou d'autres céréales. Elle est produite par plusieurs espèces de *Fusarium* souvent en cooccurrence avec le DON durant l'infection des céréales en plein champ et même durant leur stockage (Yazar et Omurtag, 2008 ; Mankevicius *et al.*, 2011). La structure chimique de cette toxine est une lactone mo

no et macrocyclique dérivée de l'acide résorcyclique avec une double liaison en position C1, C2 et un cétone en position C6 (Desjardins, 2006 ; Mankevicien *et al.*, 2011).

II.4.4. Toxicité et réglementation législative des trichothécènes

Les mycotoxines peuvent entraîner un ensemble de problèmes liés à la santé humaine et animale. Les trichothécènes sont des inhibiteurs de la biosynthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN qui peuvent engendrer des effets indésirables sur les systèmes digestif et nerveux, le foie, les reins ou réduire les défenses immunitaires chez l'homme et les animaux (Desjardins, 2006 ; Arunachalam et Doohan, 2013). La T-2 qui est considérée 10 fois plus toxique que le DON est à l'origine de l'aleucie toxique alimentaire chez les animaux. En outre, quelques nanogrammes de cette mycotoxine sont suffisants pour provoquer des irritations sévères de la peau (Kalantari et Moosavi, 2010 ; De Angelis *et al.*, 2013). En ce qui concerne les fumonisines, des études ont montré qu'il existe une relation directe entre la consommation des céréales contaminées par ces toxines et le cancer de l'œsophage humain dans certaines régions du globe. La zéaralénone dont la toxicité est relativement faible constitue une préoccupation majeure du fait qu'elle peut conduire à une hyperoestrogénie, à l'infertilité et à d'autres problèmes liés à la reproduction de l'homme et des animaux (Kotowicz *et al.*, 2014).

Des mesures législatives ont été mises en place dans plusieurs pays pour définir les teneurs maximales des mycotoxines que l'on peut admettre dans l'alimentation humaine. En Europe, le règlement 1881/2006 a été émis par la Commission Européenne quant à la présence des différentes mycotoxines dans les céréales brutes et transformées (Tableau 2) (Commission Européenne, 2007). En Algérie, les teneurs en fusariotoxines dans les aliments ne sont pas encore réglementées.

Tableau 2 Les concentrations maximales autorisées de certaines fusariotoxines dans les produits alimentaires dans l'UE (règlement n°1881/2006).

| Mycotoxines | Produits alimentaires | Seuils (µg/kg) |
|--------------------|--|-----------------------|
| Déoxynivalénol | Blé dur, maïs et avoine bruts | 1750 |
| | Pain | 500 |
| | Aliments à base de céréales pour nourrissons | 200 |
| Zéaralénone | Huile de maïs | 400 |
| | Maïs brut | 350 |
| | Céréales brutes autres que le maïs | 100 |
| | Aliments à base de céréales pour nourrissons | 20 |
| Fumonisines | Maïs brut | 4000 |
| | Maïs destiné à la consommation humaine directe | 1000 |
| | Aliments à base de maïs pour nourrissons | 200 |

II.5. DONNÉES SUR *FUSARIUM CULMORUM*

L'espèce *F. culmorum* qui est phylogénétiquement proche de *F. pseudograminearum* appartient au groupe *sambucinum* (cf. Fig. 3). Elle s'attaque à une large gamme de plantes hôtes dont les céréales (blé, orge, avoine, maïs et sorgho). Les études menées sur cette espèce qui se reproduit exclusivement par voie asexuée ont révélé la présence du locus *MAT* avec ces deux allèles *MAT1-1* et *MAT1-2* indiquant ainsi son hétérothallisme (Kerényi *et al.*, 2004 ; Obanor *et al.*, 2010 ; Rebib *et al.*, 2014).

II.5.1. Distribution géographique de *F. culmorum*

C'est une espèce cosmopolite qui est considérée comme le principal agent causal de la pourriture du collet du blé dans le monde. Elle était l'espèce dominante sur épi dans les régions à climat froid du nord et du centre de l'Europe (Scherin *et al.*, 2013). Actuellement, elle est la principale espèce qui cause la pourriture du collet et la fusariose de l'épi du blé en Tunisie, en Algérie, dans le sud de l'Italie, en Iran et en Irak (Kammoun-Gargouri *et al.*, 2009 ; Pancaldi *et al.*, 2010 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014 ; Rebib *et al.*, 2014 ; Balmas *et al.*, 2015 ; Yekkour *et al.*, 2015 ; Matny *et al.*, 2017). Dans le passé, cette espèce a été fréquemment isolée en Turquie, en Australie et aux États-Unis (Akinsanmi *et al.*, 2004 ; Smiley *et al.*, 2005 ; Tunali *et al.*, 2006).

II.5.2. Caractéristiques morphologiques de *F. culmorum*

L'espèce *F. culmorum* présente un mycélium cotonneux de couleur blanche avec des reflets jaunes, marrons ou roses et diffuse un pigment de couleur rose à rouge dans le milieu de culture PDA. Les macroconidies (30-50 × 5-7,5 µm) pourvues de 3 à 5 cloisons sont hyalines, courtes, épaisses, faiblement arquées, avec une cellule apicale arrondie et une cellule basale non développée. Les microconidies sont absentes. Les chlamydospores sont produites abondamment sur les macroconidies ou sur les hyphes où elles sont terminales ou intercalaires (Scherin *et al.*, 2013). Le mycélium, les macroconidies et les chlamydospores sont considérés comme des structures d'infection ou de survie aux conditions défavorables (Paulitz, 2006).

II.5.3. Métabolites secondaires synthétisés par *F. culmorum*

Plusieurs métabolites secondaires comme les pigments (caroténoïdes et fusarubine) et les toxines (trichothécènes, zéaralénone et culmorine) sont synthétisés par *F. culmorum*. Deux chémotypes sont classiquement distingués chez cette espèce, le chémotype I dont les souches produisent le déoxy-nivalénol ainsi que sa forme acétylée 3ADON et le chémotype II dont les souches produisent le niva-

lénol et/ou la fusarénone (Scherin *et al.*, 2013).

Les chémotypes de *F. culmorum* ont été très peu étudiés par rapport à ceux de *F. graminearum*, cependant, il est possible de déterminer leur distribution géographique en se basant sur les données disponibles. Plusieurs rapports ont confirmé que le chémotype 3ADON est prévalent dans plusieurs pays européens (Allemagne, Norvège, Danemark, Espagne, Hongrie, Italie et Angleterre) et en Afrique du Nord. En revanche, le nivalénol a été le plus dominant en France, en Belgique et aux Pays-Bas (Scherin *et al.*, 2013 ; Pasquali *et al.*, 2016a).

Le chémotype des isolats de *F. culmorum* peut être déterminé par utilisation d'amorces spécifiques de chaque type de toxine ou par des méthodes physicochimiques (Ward *et al.*, 2008). Ces dernières permettent de quantifier la toxine produite par le champignon par des techniques de chromatographie tel que l'HP-LC (Kammoun-Gargouri *et al.*, 2010), la GC-MS (Kokkonen *et al.*, 2010) et la LC-MS (Góral *et al.*, 2016). Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) qui ont été également utilisées dans le passé ne permettent le dosage que d'une seule mycotoxine (Sinha *et al.*, 1995 ; Góral *et al.*, 2016). L'avantage de ces méthodes quantitatives réside dans la possibilité d'analyse des mycotoxines présentes dans les denrées alimentaires et même dans les substrats artificiels.

II.5.4. Génome de *F. culmorum*

Un génome incomplet de la souche CS7071 de *F. culmorum* est disponible dans Genbank de NCBI sous le numéro d'accession CBMH010000000. Actuellement, le génome complet de la souche de référence UK99 de *F. culmorum* a été séquencé et officiellement mis en ligne en 2016 (<http://pre.fungi.ensembl.org>). Le résultat du séquençage a montré que la taille du génome de *F. culmorum* est de 39 Mb réparties sur 4 chromosomes (Urban *et al.*, 2016). De ce fait, *F. culmorum* possède le même nombre chromosomique que l'espèce *F. graminearum* qui lui est phylogénétiquement proche. Cependant, l'annotation du génome n'a pas été complétée jusqu'à nos jours (Sperschneider *et al.*, 2015 ; Urban *et al.*, 2016).

II.5.5. Diversité génétique des populations de *F. culmorum*

Le développement des techniques moléculaires pour l'analyse de la génétique des populations a conduit à une amélioration des connaissances de ces dernières (Nayaka *et al.*, 2011). De nombreux marqueurs moléculaires (RAPD, RFLP, ISSR, AFLP, SCAR, SSR et SNP) ont été développés pour caractériser la diversité génétique de plusieurs espèces de *Fusarium* (Nayaka *et al.*, 2011). La diversité génétique de *F. culmorum* à l'échelle régional et mondiale a été étudiée par l'emploi des marqueurs moléculaires suivants: IGS (Mishra *et al.*, 2002), ISSR (Mishra *et al.*, 2003), RAPD (Gargouri

et al., 2003), IGS-RFLP, RAPD (Tóth *et al.*, 2004) et Rep-PCR (Gürel *et al.*, 2010) et SSR (Miedaner *et al.*, 2013 ; Rebib *et al.*, 2014 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014).

Parmi ces marqueurs, les SSR sont les plus utilisés en raison de leur codominance, de leur reproductibilité ainsi que de leur variabilité. Les SSR sont des motifs (séquences courtes) répétés en tandem de type di-, tri- ou tétra-nucléotidiques, uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome. Cette abondance des SSR dans le génome offre un outil puissant pour la recherche des variations alléliques entre les souches de la même espèce (Tautz, 1989 ; Singh *et al.*, 2011b). Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des SSR réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé. Ce dernier est dû à des variations dans la longueur de la répétition des motifs. Les SSR sont amplifiables par PCR. La taille des allèles amplifiés peut être déterminée par électrophorèse sur gel ou par l'utilisation d'analyseur capillaire (Taylor et Ford, 2007).

Les marqueurs développés à partir du génome de *F. graminearum* par Suga *et al.* (2004) et Vogelgsang *et al.* (2009) ont été testés sur des populations de *F. culmorum*. Par ailleurs, Giraud *et al.* (2002) ont développé des marqueurs SSR à partir du génome de *F. culmorum*. Les SSR qui ont fait leur preuve pour la caractérisation des populations de *F. graminearum* permettent de mesurer la migration entre les populations (Ward *et al.*, 2008 ; Talas *et al.*, 2012 ; Kelly *et al.*, 2015). Ces marqueurs SSR ont été récemment utilisés pour l'étude de la variabilité génétique des populations de *F. culmorum* originaires d'Iran et de Tunisie et pour une comparaison des populations originaires de la Syrie, de la Russie et de l'Allemagne (Miedaner *et al.*, 2013 ; Rebib *et al.*, 2014 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014). Les données issues de ces études ont montré des niveaux importants de diversité et d'échange génétique entre les isolats de *F. culmorum* à l'échelle du champ, du pays ou du continent.

II.6. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA PATHOGENICITÉ

Lors de l'infection une gamme d'enzymes produite par *F. graminearum* et *F. culmorum* intervient dans la dégradation des polysaccharides de la paroi cellulaire facilitant ainsi l'invasion des tissus. Parmi ces enzymes on peut citer les xylanases, les pectinases, les glucanases et les endo et les exocellulases (Jaroszuk-Scisel et Kurek, 2012 ; AlTaweel *et al.*, 2017).

Dès les premières phases de l'infection, un dialogue moléculaire s'établit entre le champignon et la plante hôte. Les gènes codant pour les facteurs de transcription et pour les régulateurs cellulaires sont importants pour le contrôle de l'agressivité. Actuellement, 24 gènes liés à l'agressivité de *F. graminearum* sur épi ont été identifiés. Le chromosome 1 de *F. graminearum* qui semble jouer un rôle pri-

mordial dans le contrôle de l'agressivité de cette espèce sur épi contient 11 de ces 24 gènes (Fig. 7) (Talas *et al.*, 2012 ; Laurent, 2016 ; Talas *et al.*, 2016).

Afin de déterminer si les gènes impliqués dans l'agressivité de *F. graminearum* sur épi sont les mêmes sur collet, une étude a ciblé les gènes *FgMap1*, *FgTri5*, *FgTop1*, *FgNth*, *FgSnf*, *Fgl1* et *FgHog* qui sont impliqués dans l'agressivité sur épi (Stephens, 2010). Les résultats de cette étude ont révélé que les gènes *FgMap1*, *FgTri5*, *FgTop1*, *FgNth* et *FgSnf* sont aussi liés à l'agressivité sur collet. Cette même étude a permis d'identifier d'une part le gène *FgABC1* spécifique de la pourriture du collet et d'autre part le gène *FgSOD1* impliqué dans la fusariose de l'épi. Certains de ces gènes ont été plus tard identifiés chez *F. culmorum* et dénommés *FcABC1*, *FcTop1*, *FcStuA*, *FcTri5* et *FcTri6* (Skov *et al.*, 2004 ; Baldwin *et al.*, 2010 ; Lysøe *et al.*, 2011 ; Scherm *et al.*, 2011). Un nouveau gène *FcRav2* impliqué dans l'agressivité de *F. culmorum* sur collet et sur épi de blé a été récemment identifié (Spanu *et al.*, 2017). Parmi les gènes impliqués dans l'agressivité de *F. graminearum* et de *F. culmorum* sur blé, cinq (*Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri9* et *Tri14*) appartiennent au cluster *Tri* de la biosynthèse des trichothécènes (ALTaweel *et al.*, 2017).

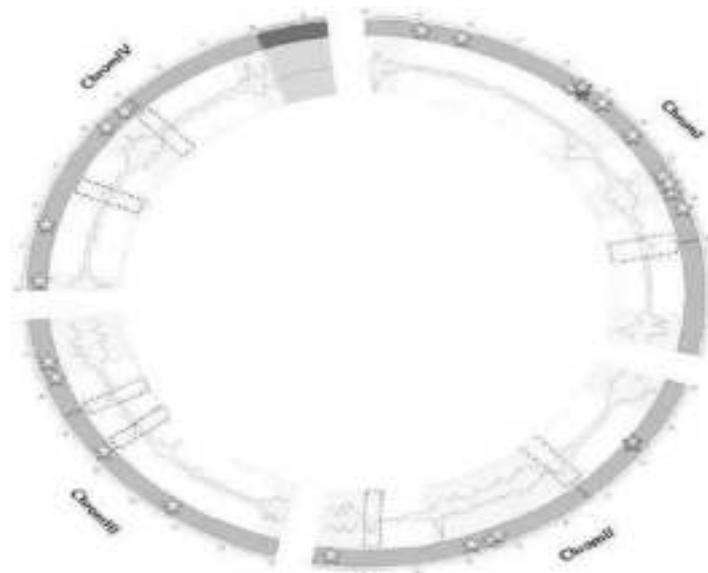


Figure 7 Localisation des différents gènes (☆☆☆☆) associés à l'agressivité sur les chromosomes de *F. graminearum* (Laurent, 2016).

II.7. ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ

Les espèces impliquées dans la pourriture du collet et la fusariose de l'épi du blé sont capables de survivre en saprophyte dans le sol, sur les résidus des cultures ou même sur les semences sous forme

de mycélium, de conidies, de périthèces ou de chlamydospores. Le vent, les éclaboussures de pluie et les insectes sont des facteurs responsables de la dispersion de l'inoculum. Si les conditions sont favorables, les structures infectieuses peuvent germer au niveau des plants et infecter ainsi les tissus (Horberg, 2002 ; Paul *et al.*, 2004 ; Paulitz, 2006).

La pourriture du collet est favorisée par des conditions humides intervenant après le semis, mais elle peut également se manifester à tous les stades de développement de la plante (Scherm *et al.*, 2013). Au fur et à mesure que les plants de blé émergent du sol, la base des tiges entre en contact avec le sol ce qui facilite le dépôt des spores au niveau des racines et du collet. Le mycélium issu de la germination des spores colonise la surface des racines et du collet. La pénétration des tissus de l'hôte se réalise à travers les blessures engendrées par l'émergence des racines secondaires. La colonisation des tissus s'effectue uniquement à la base de la plante sans dépasser les premiers entrenœuds. Au moment de la colonisation des tissus du collet et des racines, les trichothécènes produites par *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. pseudograminearum* sont diffusées en avance du champignon vers l'épi où elles contaminent les graines en formation (Xu *et al.*, 2008 ; Covarelli *et al.*, 2012). En outre, l'infection des racines et du collet inhibe le mouvement ascendant de l'eau et des éléments nutritifs vers les épis ce qui conduit à leur dessèchement. Les symptômes de la maladie n'apparaissent qu'après 14 jours après l'inoculation (Mudge *et al.*, 2006 ; Covarelli *et al.*, 2012). La sévérité de la pourriture du collet augmente lorsque les plants infectés sont soumis à un stress hydrique accompagné d'une élévation de la température (Chekali *et al.*, 2011 ; Scherm *et al.*, 2013).

Le développement de la fusariose de l'épi se réalise au stade floraison, indépendamment de la température, cependant il exige une humidité élevée (Vaughan *et al.*, 2016). L'infection est initiée par l'adhésion des spores sur les épis au moment de la floraison. Le tube germinatif issu de la spore se développe à la surface des épillets puis il colonise les tissus et progresse vers l'ovaire. La pénétration dans l'épi s'effectue au niveau des glumes via les stomates ou les blessures (Champeil *et al.*, 2004 ; Brown *et al.*, 2010). Après la pénétration, le champignon progresse d'un épillet à un autre à travers les vaisseaux conducteurs du xylème et du phloème. Ces derniers montrent le plus souvent des occlusions qui limitent le flux des éléments nutritifs. Les premiers symptômes de la fusariose de l'épi apparaissent quelques jours après l'infection (Ribichich *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2010).

II.8. FACTEURS FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ

La sévérité des attaques des espèces de *Fusarium* est conditionnée principalement par des facteurs

climatiques, agronomiques et physiologiques (Alvarez *et al.*, 2010).

Les conditions climatiques (température et humidité) influencent le développement de la fusariose de l'épi et de la pourriture du collet du blé. Elles varient cependant selon le pathosystème considéré (Ferrigo *et al.*, 2016). Chaque espèce du complexe fusarien exige ses propres conditions optimales de température et d'humidité ce qui peut expliquer en partie la variation de la distribution géographique des espèces. C'est ainsi qu'une humidité élevée et des températures modérées favorisent le développement de *F. graminearum*, alors que des conditions plus sèches sont favorables au développement de *F. culmorum* (Beyer *et al.*, 2014 ; Ferrigo *et al.*, 2016). Des souches appartenant à la même espèce et originaires de régions géographiques différentes peuvent également avoir des exigences climatiques différentes par rapport à leur climat d'origine (Doohan *et al.*, 2003 ; Xu et Nicholson, 2009).

Les facteurs physiologiques qui influencent le développement de la fusariose de l'épi sont le niveau de la résistance, le stade de développement, la date et la durée de la floraison, la structure des épis, la densité des épillets et la taille de la plante (Champeil *et al.*, 2004 ; Audenaert *et al.*, 2009 ; Vaughan *et al.*, 2016). La pourriture du collet est conditionnée par la taille de la plante et son niveau de résistance. Les plantes de grande taille semblent présenter une plus grande résistance à la pourriture du collet (Liu *et al.*, 2010).

Certains facteurs agronomiques ont un impact important sur la conservation de l'inoculum primaire. Un précédent céréale (maïs, blé, orge) sensible à la pourriture du collet et à la fusariose de l'épi constitue une source potentielle d'inoculum pour les prochaines cultures (McMullen *et al.*, 1997 ; Vogelgsang *et al.*, 2011). De même, l'enfouissement des résidus de cultures par des labours profonds diminue les risques d'infection lors des prochaines campagnes. Il a été également démontré que les taux d'azote élevés dans le sol favorisent la pourriture du collet en augmentant la sensibilité des plants à cette maladie (Carver, 2009 ; Moya-Elizondo, 2013).

II.9. LUTTE CONTRE LA POURRITURE DU COLLET ET LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ

II.9.1. Lutte culturale

Les résidus des cultures constituent la principale source d'inoculum. À cet effet, plusieurs pratiques culturales peuvent contribuer à une réduction de la quantité d'inoculum et donc limiter le développement de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi. Parmi les principales pratiques culturales, on peut citer: la gestion des résidus par des labours profonds et la rotation des cultures. L'introduction de cultures non hôtes dans les rotations réduit la quantité d'inoculum présent dans le

sol (Wegulo *et al.*, 2015 ; Moya-Elizondo et Jacobsen, 2016). Néanmoins, la longévité des chlamydospores de certaines espèces de *Fusarium* comme *F. culmorum* et *F. pseudograminearum* rend la rotation plus ou moins inefficace (Cook, 2010). Une réduction de la densité du semis ainsi qu'une irrigation et une fertilisation azotée adéquates peuvent jouer un rôle dans le contrôle de ces maladies et dans l'accumulation du DON dans les graines (Gilbert et Haber, 2013 ; Moya-Elizondo et Jacobsen, 2016).

II.9.2. Lutte chimique

L'application de fongicides appartenant principalement aux groupes chimiques des azoles et des strobines réduit la fusariose de l'épi (>70%) et l'accumulation des mycotoxines. Ces fongicides montrent également une certaine efficacité dans la prévention des attaques de la pourriture du collet (Menniti *et al.*, 2003 ; Nielsen, 2013 ; Scherm *et al.*, 2013 ; Moya-Elizondo et Jacobsen, 2016 ; Machado *et al.*, 2017). En Algérie, parmi les fongicides homologués dans la lutte contre la fusariose de l'épi et la pourriture du collet on peut citer: le dividend[®] (difenoconazole), le dividend star[®] (cyproconazole + difenoconazole), le fenraz 400 ec[®] (prochloraze), le horizell 25 ec[®] (tebuconazole) et le vitavax 200 ff[®] (carboxine + thirame) (Anonyme, 2015). Par ailleurs, l'efficacité des matières actives varie d'une espèce de *Fusarium* à une autre. Certaines matières actives sont devenues inefficaces à cause de l'apparition du phénomène de résistance chez certaines souches (Terzi *et al.*, 2014). L'emploi de semences traitées par un fongicide est un moyen de protection très efficace vis-à-vis de la pourriture du collet durant les premiers stades de développement de la culture (Balmas *et al.*, 2006 ; Moya-Elizondo et Jacobsen, 2016). Un traitement précoce par pulvérisation au stade montaison ou au début de la floraison constitue un moyen de lutte efficace contre la fusariose de l'épi (Blandino *et al.*, 2009).

II.9.3. Lutte biologique

Plusieurs microorganismes antagonistes ont été testés contre les espèces de *Fusarium* impliquées dans la pourriture du collet et la fusariose de l'épi. Des biopesticides et des biofertilisants à base de *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Trichoderma* spp. sont actuellement commercialisés (Harman *et al.*, 2012 ; Dendouga *et al.*, 2016 ; Palazzini *et al.*, 2016 ; Comby *et al.*, 2017). Certaines levures appartenant aux genres *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Cryptococcus* ont été également testées contre *F. graminearum* et *F. culmorum* (Khan *et al.*, 2004 ; Schisler *et al.*, 2014 ; Legrand *et al.*, 2017). De même, le rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski, 1880) Ash *et al.* 1994 s'est avéré moyennement efficace vis-à-vis de la pourriture du collet du blé (Lounaci *et al.*, 2016). La plupart de ces microorganismes sont appliqués par enrobage des semences pour protéger la plante contre la pourriture

du collet ou par pulvérisation au stade floraison afin de lutter contre la fusariose de l'épi (Scherer *et al.*, 2013). Le ver de terre *Lumbricus terrestris* L., 1758 s'est également révélé efficace contre *F. culmorum* par la réduction de sa biomasse dans le sol (Meyer-Wolfarth *et al.*, 2017).

II.9.4. Sélection variétale

L'utilisation de variétés de blé présentant une résistance à l'égard de l'infection primaire et de la propagation de la pourriture du collet et la fusariose de l'épi apparaît comme une méthode de lutte prometteuse. Malheureusement, jusqu'à nos jours aucune variété de blé ayant montré une résistance totale à la pourriture du collet et la fusariose de l'épi n'a été identifiée. Plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à l'identification et à la localisation des QTLs associés avec la résistance à la pourriture du collet et à la fusariose de l'épi chez le blé.

Une certaine tolérance à la pourriture du collet a été enregistrée chez les lignées australienne Sunco et 2-49 où plusieurs QTLs de résistance localisés sur les chromosomes 3BL, 2B, 4B et 7A ont été identifiés (Collard *et al.*, 2005). Le QTL localisé sur le chromosome 3BL qui confère la plus grande résistance à la pourriture du collet a été identifié plus tard chez d'autres variétés de blé (CSCR6, Ernie, Macon, etc.). Récemment, plusieurs autres sources de résistance à la pourriture du collet ont été identifiées (Liu et Ogonnaya, 2015).

Quelques QTLs (*Fhb1*, *Fhb2*, *Fhb4* et *Fhb5*) à effet majeur dans la résistance à la fusariose de l'épi ont été identifiés chez les variétés Fontana et Sumai3 (Liu *et al.*, 2004). Ces QTLs peuvent entraîner une réduction des symptômes de la fusariose de l'épi de 15 à 60%. Cependant, le QTL *Fhb1* permet une réduction plus importante des symptômes et une détoxification du DON (Liu *et al.*, 2004 ; Dweba *et al.*, 2017). Une nouvelle variété résistante à la fusariose de l'épi a été développée récemment par l'introgession du QTL *Fhb1* dans la variété française *Jaceo* (Mardi *et al.*, 2006 ; Buerstmayr *et al.*, 2014 ; Prat *et al.*, 2014). Il est à noter qu'aucune résistance vis-à-vis de la pourriture du collet n'a été observée chez les variétés Fontana et Sumai3 (Liu *et al.*, 2004).

II.9.5. Lutte intégrée

Une combinaison de méthodes de lutte culturales, chimiques, biologiques et génétiques constitue une meilleure approche permettant de minimiser l'incidence de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi. Une amélioration des pratiques culturales, l'utilisation de variétés plus ou moins résistantes ainsi que l'utilisation des agents antagonistes couplés à des doses raisonnables de fongicides

constituent le moyen de lutte le plus efficace contre la pourriture du collet et la fusariose de l'épi (Gilbert et Haber, 2013 ; Terzi *et al.*, 2014 ; Moya-Elizondo et Jacobsen, 2016).

Matériels et méthodes

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1. IDENTIFICATION DES AGENTS RESPONSABLES DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ EN ALGÉRIE

III.1.1. Collecte des échantillons

Durant les campagnes agricoles de 2013-2014 et de 2014-2015, des prospections ont été réalisées dans 30 wilayas représentatives des différentes régions céréalières de l'est, du centre et de l'ouest du pays et distribuées dans les étages bioclimatiques humide, subhumide, semi-aride et aride (Fig. 8).

Au cours de ces deux campagnes agricoles, les prospections ont été réalisées sur 500 champs de blé dur et tendre. Ces prospections ont été effectuées sur des parcelles choisies aléatoirement et séparées les unes des autres par une distance d'au moins 1 Km. Au niveau de chaque parcelle des plants (30 environ) présentant soit les symptômes typiques de la pourriture du collet (brunissement du collet et dessèchement prématuré des épis), soit ceux de la fusariose de l'épi (dessèchement partiel ou total des épis associé accompagné souvent d'amas de spores oranges), soit ceux des deux maladies à la fois, ont été prélevés. Les prélèvements ont été réalisés au stade remplissage des grains durant les mois d'avril et de mai des années 2014 et 2015. Les plants collectés ont été conservés dans des sacs en papier Craft jusqu'au moment de l'isolement des agents causaux. Les données des sites prospectés (wilaya, commune, etc.) ainsi que la date de collecte des échantillons ont été notées.

III.1.2. Isolement, purification par culture monospore et conservation

Sur les plants collectés au niveau de chaque parcelle, 5 ont été choisis aléatoirement pour effectuer les isolements. Sur chaque plant de blé, deux isolements ont été réalisés l'un à partir du collet et l'autre à partir de l'épi. Les parties présentant les symptômes sur collet et sur épis ont été découpées en petits fragments d'environ 1 cm de longueur, désinfectées dans l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min, rincées dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile pendant 5 min chacun et enfin séchées entre deux feuilles de papier Joseph stérile. Cinq fragments ont été ensuite déposés dans chaque boîte de Petri contenant un milieu PDA (Annexe 2). Les cultures ont été ensuite incubées à une température comprise entre 20 et 22°C dans une chambre de culture sous une lumière blanche continue. Après 4 à 5 jours d'incubation, de petits explants fongiques ont été prélevés à la périphérie des colonies développées puis transférés dans de nouvelles boîtes de Petri contenant un milieu PDA.

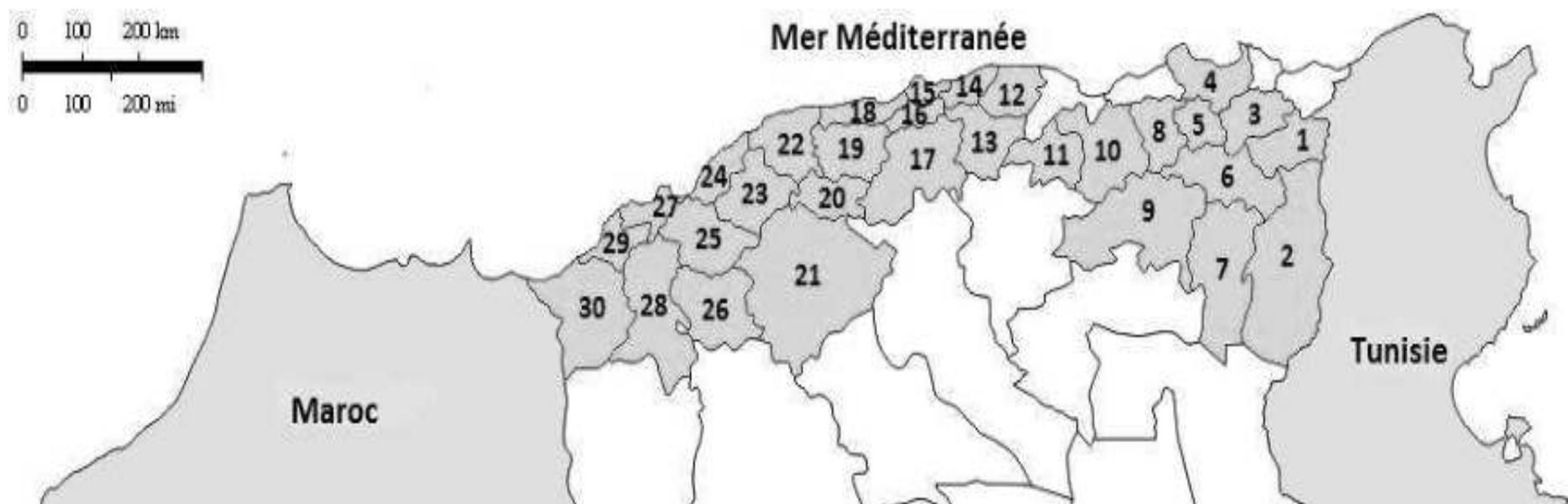


Figure 8 Wilayas prospectées en 2014 et en 2015 (en vert). 1. Souk Ahrass. 2. Tébessa. 3. Guelma. 4. Skikda. 5. Constantine. 6. Oum El Bouaghi. 7. Khenchla. 8. Mila. 9. Batna. 10. Sétif. 11. Bordj Bou Arreridj. 12. Tizi Ouzou. 13. Bouira. 14. Boumerdès. 15. Alger. 16. Blida. 17. Médéa. 18. Tipaza. 19. Ain Defla. 20. Tis-sensilt. 21. Tiaret. 22. Chlef. 23. Relizane. 24. Mostaganem. 25. Mascara. 26. Saïda. 27. Oran. 28. Sidi Bel Abbés. 29. Ain Témouchent. 30. Tlemcen.

Après 7 jours d'incubation, une suspension de spores de 10^2 conidies/mL a été préparée à partir de chaque culture. Une goutte de cette suspension a été prélevée et étalée uniformément sur les boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée à 2% (Annexe 2). Les boîtes ont été ensuite incubées dans une chambre de culture à une température comprise entre 20 et 22°C sous une lumière blanche continue. Après 24 heures d'incubation, une spore en germination a été prélevée sous une loupe binoculaire et repiquée dans une boîte de Petri contenant un milieu PDA. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours dans une chambre de culture à une température comprise entre 20 et 22°C sous une lumière blanche continue. Après purification, les isolats ont été conservés à -20°C dans du glycérol à 15%.

III.1.3. Identification morphologique des isolats

Pour l'identification morphologique des isolats, des explants mycéliens ont été prélevés à partir des cultures monospores et transférés sur les milieux PDA, CLA et SNA (Annexe 2). Les isolats appartenant au genre *Fusarium* ont été identifiés selon les critères macroscopiques et microscopiques établis par Nelson *et al.* (1983) et Leslie et Summerell (2006). Ces critères sont la vitesse de la croissance des isolats, l'aspect et la coloration du mycélium, la présence ou l'absence de pigment et de sporodochies dans le milieu de culture PDA, la taille et la forme des macroconidies, la présence ou l'absence des microconidies et des chlamydo-spores ainsi que leurs formes sur les milieux SNA et CLA. L'identification morphologique des isolats appartenant au genre *Microdochium* (*M. nivale* et *M. majus*) a été basée sur les critères culturels et microscopiques établis par Samuel et Hallet (1983) et Hoshino *et al.* (2009). Ces critères sont l'aspect et la coloration du mycélium sur milieu PDA, la taille et la forme des conidies, l'absence de phialides et la présence des cellules conidiogènes annélidiques.

III.1.4. Identification moléculaire des isolats

L'identification morphologique des espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Microdochium* ne permet pas, le plus souvent, de distinguer les espèces. Pour cela, un séquençage d'une portion du gène *TEFI- α* a été réalisé afin de confirmer l'identité des isolats de *Fusarium* spp. Une PCR classique utilisant des amorces spécifiques a été utilisée pour la distinction des espèces de *Microdochium* (*M. nivale* et *M. majus*).

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée sur les isolats en conservation qui ont été cultivés, dans un premier temps, sur un milieu d'eau gélosée à 3% (Annexe 2) contenant 2 mL/L de solution de pénicilline, streptomycine et néomycine (5000 unités de pénicilline, 5 mg de streptomycine

et 10 mg de néomycine par mL), puis transférés, dans un second temps, sur un milieu de culture YMB (Annexe 2). Des tubes contenant 25 mL de ce milieu de culture ont été inoculés par 5 fragments mycéliens prélevés à partir du milieu d'eau gélosée à 3%. Les tubes sont ensuite incubés à 24°C pendant 4 jours sous agitation continue (100 rpm). Après incubation, le mycélium a été collecté par filtration puis congelé, lyophilisé et finalement broyé en poudre fine.

L'ADN génomique total a été extrait suivant le protocole établi par O'Donnell *et al.* (1998). Le mycélium broyé a été récupéré dans 700 µL de tampon CTAB dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. L'ADN a été extrait dans 700 µL de chloroforme. Le mélange mycélium, CTAB et chloroforme a été centrifugé à 14 000 rpm pendant 10 min. Après centrifugation, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube auquel on a rajouté 350 µL d'isopropanol (à -20°C) pour précipiter l'ADN. Le culot récupéré après centrifugation à 14 000 rpm pendant 3 min a été lavé avec 1000 µL d'éthanol à 70%, les tubes ont été laissés ouverts afin de permettre l'évaporation de l'éthanol. L'ADN obtenu a été dissout dans 200 µL d'eau ultra pure stérile puis conservé à -20°C.

III.1.4.1. Identification moléculaire des isolats de *Fusarium* spp. par séquençage du gène *TEF1-α*

Afin de confirmer l'identification morphologique des isolats de *Fusarium* spp., une portion de 750 pb du gène *TEF1-α* a été amplifiée par les amorces EF-1 et EF-2 (Tableau 3) selon le protocole établi par O'Donnell *et al.* (1998). Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume final de 40 µL contenant 1x tampon de la PCR, 2,5 mM de MgSO₄, 0,8 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate, 10 pmol de chaque amorce, 0,8 U de Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase et 10 ng d'ADN génomique. Les PCRs ont été conduites dans un thermocycleur de type Applied Biosystems 9700 (ABI 9700) selon le programme suivant: une dénaturation initiale à 94°C pendant 90 s suivie de 40 cycles de 94°C pendant 30 s (dénaturation), 55°C pendant 30 s (hybridation), 68°C pendant 2 min (élongation), suivie par une extension finale à 68°C pendant 5 min et enfin un refroidissement à 4°C. Les produits d'amplifications ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5% dans le tampon TAE à 1x sous 150 V pendant 15 min. Pour chaque échantillon, 10 µL du tampon de charge ont été rajoutés à 2 µL de produits de PCR et puis déposés dans chaque puits. Le gel a été ensuite trempé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 15 min puis visualisé sous une lumière UV. Un marqueur de poids moléculaire (100 pb) a été utilisé pour déterminer la taille des bandes obtenues.

Les amplifiats ont été purifiés de tout excès d'amorces. Une fois purifié l'ADN a été séquencé par l'amorce EF-22T (Tableau 3) dans un volume réactionnel de 10 µL qui contient 5x tampon de sé-

quençage, 0,5 µL de Big Dye (contenant les dNTP, les ddNTP, la *Taq* polymérase et le MgSO₄), 10 pmol d’amorce de séquençage et 50 ng d’ADN à séquencer. Les réactions de séquençage ont été réalisées dans un thermocycleur ABI 9700 selon le programme suivant: 15 s à 96°C, 40 cycles de 96°C pendant 15 s, 10 s à 50°C, 4 min à 60°C suivies par un refroidissement à 4°C. Les produits des réactions de séquençage ont été nettoyés par l’utilisation du big dye XTerminator pour éliminer les excès des désoxyribonucléotides. Les échantillons ont été placés dans un séquenceur capillaire ABI 3730 48 au niveau de l’unité de recherche “Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research” (ARS-USDA, Peoria, USA).

Les séquences obtenues ont été nettoyées et corrigées par le logiciel Sequencher v.5.2.4 puis comparées aux séquences de références publiées dans les banques génomiques NCBI (Fig. 9) et *Fusarium MLST* (Fig. 10) pour déterminer l’espèce de l’isolat séquencé. Après identification, les séquences générées des isolats ont été alignées par le logiciel Seaview v.1.4.

Tableau 3 Les amorces utilisées pour l’identification des isolats de *Fusarium* spp.

| Amorces | Séquences (5'-3') | Référence |
|---------|-----------------------|--------------------------------|
| EF-1 | ATGGGTAAGGARGACAAGAC | O'Donnell <i>et al.</i> (1998) |
| EF-2 | GGARGTACCAGTSATCATGTT | » |
| EF-22T | AGGAACCCTTACCGAGCTC | » |

III.1.4.2. Identification moléculaire des isolats de *Microdochium* spp. par PCR

Les isolats de *M. nivale* et *M. majus* ont été identifiés en utilisant les amorces spécifiques Y13Nf/Y13Nr (*M. nivale*) et Mnm2f/Mnm2r (*M. majus*) (Tableau 4). L’amplification par PCR a été réalisée dans un volume de 25 µL contenant 10 ng d’ADN génomique, 1x tampon de PCR, 0,2 mM de chaque dNTP, 10 pmole de chaque amorce et 1,5 U de *Taq* polymérase. L’amplification de l’ADN a été conduite dans un thermocycleur Biometra (T-1, Göttingen, Germany) en utilisant le programme suivant: une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min suivie par 40 cycles de 95°C pendant 30 s (dénaturation), 58°C pendant 30 s (hybridation), 40°C pendant 1 min 12 s (élongation), suivie par une élongation finale à 72°C pendant 5 min et en fin un refroidissement à 4°C. Les ADN des souches 169 (*M. nivale*) et 167 (*M. majus*) ont été utilisés comme témoins positifs. L’eau ultra pure stérile a été utilisée comme témoin négatif. La migration des produits amplifiés a été réalisée sur un gel d’agarose à 1,5% dans un tampon TAE à 1x sous 100 V pendant 30 min. Le gel a été coloré au bromure d’éthidium et visualisé sous une lumière UV. Un marqueur de poids moléculaire (100 pb) a été utilisé pour déterminer la taille des bandes obtenues.



Figure 10 Capture de l'interface web de Blast de NCBI.



Figure 9 Capture de l'interface web de *Fusarium MLST*.

Tableau 4 Les couples d'amorces des deux espèces *M. nivale* et *M. majus*.

| Amorces | Espèces | Séquences (5'-3') | Amplicons (pb) | Références |
|---------|------------------|------------------------|----------------|--------------------------------|
| Y13Nf | <i>M. nivale</i> | ACCAGCCGATTTGTGGTTATG | 310 | Nicholson <i>et al.</i> (1998) |
| Y13Nr | | GGTCACGAGGCAGAGTTCG | | |
| Mnm2f | <i>M. majus</i> | TGCAACGTGCCAGAAGCT | 750 | Nicholson et Parry (1996) |
| Mnm2r | | AATCGGCGCTGTCTACTAAAAG | | |

Les souches de *Fusarium* spp. et de *Microdochium* spp. identifiées ont été conservées à -80°C dans du glycérol à 15% au niveau de l'unité de recherche "Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research" (ARS-USDA, Peoria, USA).

Après identification des isolats obtenus, l'espèce *F. culmorum* la plus fréquemment isolée lors de cette étude ($n = 139$) a été sélectionnée pour l'évaluation de son pouvoir pathogène, de son potentiel toxigène et de sa diversité génétique. Pour une étude plus globale de la structure génétique de cette espèce, la collection algérienne de *F. culmorum* a été complétée par des isolats provenant d'Italie ($n = 29$), d'Australie ($n = 33$) et des États-Unis ($n = 30$). L'ADN de ces isolats a été extrait et leur identité a été confirmée par séquençage du *TEF1- α* selon les protocoles précédemment utilisés.

III.1.5. Description morphologique des espèces identifiées

Les isolats identifiés ont été cultivés sur milieu PDA, SNA et CLA sous une lumière blanche continue à 25°C afin d'étudier leurs caractéristiques culturales et microscopiques.

III.2. ÉTUDE DU POUVOIR TOXINOGENÈ DES ISOLATS DE *F. CULMORUM*

III.2.1. Détermination du chémotype des isolats de *F. culmorum* par ASO PCR

Le chémotype des isolats appartenant à l'espèce *F. culmorum* a été déterminé par une version multiplexe du test ASO PCR spécifique à l'identification des chémotypes développé par Ward *et al.* (2002) et Starkey *et al.* (2007). En fonction des séquences des deux gènes *Tri3* et *Tri12* impliqués dans la production des trichothécènes deux séries d'amorces ont été utilisées. La réaction multiplexe du gène *Tri3* contient une amorce anti sens commune à tous les chémotypes (3CON) et trois amorces sens spécifiques de chaque chémotype (3NA pour le NIV, 3D15A pour le 15ADON et 3D3A pour le 3ADON) tandis que la réaction multiplexe du gène *Tri12* contient une amorce anti sens commune à tous les chémotypes (12CON) et trois amorces sens spécifiques de chaque chémotype (12NF pour le NIV, 12-15F pour le 15ADON et 12-3F pour le 3ADON) (Tableau 5).

Tableau 5 Les couples d'amorces utilisés pour la détermination des chémotypes (Starkey *et al.*, 2007).

| Amorces | Séquences (5'-3') | Amplicons (pb) | Gène |
|---------|---------------------|----------------|--------------|
| 3CON | TGGCAAAGACTGGTTCAC | | <i>Tri3</i> |
| 3D3A | CGCATTGGCTAACACATG | 243 | <i>Tri3</i> |
| 3D15A | ACTGACCCAAGCTGCCATC | 610 | <i>Tri3</i> |
| 3NA | GTGCACAGAATATACGAGC | 840 | <i>Tri3</i> |
| 12CON | CATGAGCATGGTGATGTC | | <i>Tri12</i> |
| 12-3F | CTTTGGCAAGCCCGTGCA | 410 | <i>Tri12</i> |
| 12-15F | TACAGCGGTCGCAACTTC | 670 | <i>Tri12</i> |
| 12NF | TCTCCTCGTTGTATCTGG | 840 | <i>Tri12</i> |

Les réactions multiplexes ont été effectuées dans un volume réactionnel de 10 µL avec 1x tampon de PCR, 2,5 mM MgSO₄, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,2 mM de chaque amorce, 0,5 U de Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase et environ 10 ng de l'ADN génomique. Les PCRs ont été menées dans un thermocycleur ABI 9700 avec une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie par 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 54°C, une élongation finale de 2 min à 68°C suivie d'un refroidissement à 4°C. Trois souches de référence dont le chémotype est connu ont été utilisées comme témoin positif (*F. culmorum* NRRL 34640 pour le NIV, *F. culmorum* NRRL 34189 pour le 3ADON et *F. graminearum* NRRL 37458 pour le 15ADON). L'eau ultra pure stérile a été utilisée comme témoin négatif.

Les produits d'amplification ont été fractionnés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE à 1x sous 150 V pendant 40 min. Le gel a été ensuite trempé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 15 min puis visualisé sous une lumière UV. La taille des bandes obtenues a été déterminée par comparaison à un marqueur de poids moléculaire (100 pb).

Les ratios des chémotypes des populations de *F. culmorum* des différents pays (Algérie, Australie, Italie et États-Unis) ont été déterminés. L'hypothèse nulle a été testée en utilisant des tests chi-deux (χ^2) avec un degré de liberté. Les ratios des chémotypes ont été considérés significativement différents de 1:1 pour $P < 0,05$.

III.2.2. Détermination du potentiel toxigène des isolats de *F. culmorum* sur milieu liquide par GC-MS

La capacité de 134 isolats algériens de *F. culmorum* à produire les trichothécènes (déoxynivalénol et nivalénol) et la sesquiterpène tricyclique la culmorine *in vitro* a été mesurée par GC-MS sur un milieu liquide à base d'agmatine (Annexe 2) (Gardiner *et al.*, 2009). Des tubes de 50 mL contenant 20

mL de milieu de culture à base d'agmatine ont été inoculés par cinq explants mycéliens de 2 mm de diamètre prélevés à l'aide d'un emporte-pièce à partir des cultures de *F. culmorum* sur le milieu V8 (Annexe 2). Les tubes sont ensuite incubés à 28°C pendant 7 jours sous une agitation continue (200 rpm). Chaque culture a été extraite avec 8 mL d'acétate d'éthyle et évaporée à sec sous un flux d'azote liquide. Les échantillons secs ont été remis en suspension dans 1 mL d'acétate d'éthyle, puis analysés par GC-MS. Cette analyse a été effectuée à l'aide d'un chromatographe couplé à un spectromètre détecteur de masse 5973 (Agilent, Santa Clara CA) équipé d'une colonne HP-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de fractionnement de 20 mL/min et un rapport de division de 20:1. Après injection de l'échantillon, la température de la colonne a été programmée à 150°C pendant une minute, puis elle a été augmentée jusqu'à 280°C avec un gradient de 30°C/min puis maintenue à cette température pendant 7 min et 7s. L'identification des composés a été réalisée par comparaison avec des toxines standards.

III.2.3. Détermination du potentiel toxigène des isolats de *F. culmorum* sur graines de riz par GC-MS

Les isolats de *F. culmorum* qui n'ont produit aucune toxine dans le milieu de culture à base d'agmatine (21 isolats) ont été cultivés dans des flacons sur un substrat à base de riz (Annexe 2). Ce substrat a été inoculé par 5 explants mycéliens de 2 mm de diamètre provenant de cultures de *F. culmorum* sur milieu V8. Les flacons sont ensuite incubés à 28°C pendant 7 jours sous une agitation continue (200 rpm). Les extractions des toxines ainsi que l'analyse par GC-MS ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment.

III.3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES ISOLATS DE *F. CULMORUM*

III.3.1. Détermination du type sexuel des isolats de *F. culmorum*

Le type sexuel des isolats de *F. culmorum* des différents pays a été déterminé par l'utilisation de deux couples d'amorces spécifiques: CUL-1-f/ CUL-1-r pour le *MAT1-1* et CUL-2-f/ CUL-2-r pour le *MAT1-2* (Tableau 6). Le volume réactionnel contient 1x tampon de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de chaque dNTP, 0,25 mM de chaque amorce, 1 U de Platinum[®] Taq DNA Polymerase et 20 ng d'ADN génomique. Les PCRs ont été conduites dans un thermocycleur ABI 9700 selon le programme suivant: une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie par 30 cycles constitués de 30 s à 94°C, 30 s à 58 ou 61°C (selon l'amorce), 5 min à 68°C et en fin une élongation finale à 68°C pendant 5 min suivie par un refroidissement à 4°C. L'eau ultra pure stérile a été utilisée comme té-

moins négatif. Des souches de référence dont le mating type est connu (NRRL 29376 et 29365 pour le *MATI-1* et NRRL 29381 et 23374 pour le *MATI-2*) ont été utilisées comme témoin positif.

La migration des produits d'amplification a été réalisée sur un gel d'agarose à 1,5% dans un tampon TAE à 1x. Le gel a été ensuite trempé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 15 min puis visualisé sous une lumière UV. La taille des bandes amplifiées a été déterminée par comparaison à un marqueur de poids moléculaire (100 pb).

Tableau 6 Les couples d'amorces utilisés pour la détermination des mating types (Kerényi *et al.*, 2004).

| Amorces | Séquences (5'-3') | Amplicons (pb) |
|---------|---------------------------|----------------|
| CUL-1f | AATTCATCTCTCCTGGCCTTTTGC | 200 |
| CUL-1r | ATTTCTCAGCCCTAGATCTCATTGC | |
| CUL-2f | TTCAGAACGCCAGCAGGACCAG | 260 |
| CUL-2r | GAGCGGGACGTTTGTGCCTACTTA | |

Les ratios des mating types des populations de *F. culmorum* des différents pays (Algérie, Australie, Italie et États-Unis) ont été déterminés. L'hypothèse nulle a été testée en utilisant des tests chi-deux (χ^2) avec un degré de liberté. Les ratios des mating types ont été considérés significativement différents de 1:1 pour $P < 0,05$.

III.3.2. Étude de la diversité génétique des isolats de *F. culmorum* par les marqueurs SSR

Des séquences du génome complet de la souche KOD 1161 (= IL 196, Mila, Oued El Othmánya) ont été générées par un séquenceur MiSeq- Illumina. Des applications dans le logiciel CLC Genomics Workbench (CLC bio, Qiagen, Aarhus, Denmark) ont été utilisées pour assembler les séquences générées. Une fois assemblé le génome a été annoté par l'utilisation du logiciel AUGUSTUS. Le génome de la souche UK99 (Urban *et al.*, 2016) a été importé à partir de la base de données "European Nucleotide Archive". L'application BLASTn dans le CLC Genomics Workbench a été utilisée pour localiser les différents marqueurs SSR, le gène *MATI-2* du mating type et le gène *Tri5* des trichothécènes sur le génome des deux souches de *F. culmorum* (UK99 et KOD 1161).

Une série de 11 marqueurs SSR a été utilisée pour caractériser le polymorphisme génétique et la structure de la collection des 231 isolats de *F. culmorum* provenant d'Algérie ($n = 139$), d'Italie ($n = 29$), d'Australie ($n = 33$) et des États-Unis ($n = 30$). Ces marqueurs sont F1, F3, F4, F6, F7, F9, F10, F11 (Giraud *et al.*, 2002), HK1043 (Suga *et al.*, 2004), SSR23 et SSR24 (Vogelgsang *et al.*, 2009).

Les séquences de ces marqueurs, leurs températures d'hybridation, leurs tailles, etc. sont indiquées dans le tableau 7. Les amorces sens "forward" de chaque SSR ont été marquées par un fluorochrome (6-FAM pour F1, F6, F10 et SSR23, HEX pour F3, F7, F11 et SSR24 et NED pour F4, F9 et HK1043). Les réactions d'amplification de l'ADN ont été conduites dans un volume réactionnel total de 10 μ L contenant 1x tampon de PCR, 2,5 mM de $MgSO_4$, 2,5 mM de chaque dNTP, 10 pmol de chaque amorce, 0,2 U de Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase et approximativement 100 ng d'ADN génomique. Les marqueurs SSR ont été amplifiés dans un thermocycleur ABI 9700 selon le programme suivant: une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie par 25 cycles de 1 min à 95°C, une hybridation pendant 1 min à une température déterminée selon le marqueur (Tableau 7), une élongation pendant 1 min à 68°C, une extension finale de 10 min à 68°C et un refroidissement à 4°C. Les réactions de PCR ainsi que l'électrophorèse sur l'analyseur automatique ont été réalisées en multiplexes définis en fonction de la température d'hybridation et des fluorochromes. Quatre multiplexes ont pu être définis, 3 constitués de 3 marqueurs et un regroupant deux couples d'amorces.

Pour le génotypage, 3 μ L de produits d'amplification ont été dilués dans 12 μ L d'eau ultra pure stérile. Un volume de 0,5 μ L de produits de PCR de chaque microsatellite dilué a été déposé dans chaque puits d'une plaque de 96 puits. Dans chaque puits, on ajoute 9 μ L d'un mix constitué de 9 μ L d'une solution dénaturante de Hi-Di Formamide et de 1 μ L d'un marqueur de taille (ROX GS500) servant pour l'étalonnage des poids moléculaires. Les plaques ont été chauffées à 95°C pendant 2 min, puis placées tout de suite dans un congélateur à -20°C pendant 2 min. Afin d'éliminer les éventuelles bulles qui rendent l'injection de la solution dans le capillaire impossible, les plaques ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 1 min. Ces dernières ont été ensuite analysées dans un analyseur génétique automatique ABI 3100. Les allèles amplifiés sont séparés par électrophorèse dans des capillaires contenant un polymère d'acrylamide. La couleur du fluorochrome permet de différencier les différents marqueurs. Les différents fluorochrome 6-FAM, HEX et NED fluorescent respectivement dans le bleu, le jaune et le noir.

Le logiciel GeneMapper v3.7 a été utilisé pour assigner une taille à chaque allèle détecté. Les ADN des isolats pour lesquels le signal est incertain ou absent ont été repassés. En règle générale, si l'incertitude ou le signal n'est pas résolu au bout du troisième passage, la donnée de l'isolat est considérée comme manquante (allèle nul). Dans le cas où deux allèles ou plus sont nuls, l'isolat est éliminé de l'étude.

Tableau 7 Les marqueurs SSR utilisés pour l'étude de la diversité génétique de *F. culmorum*.

| Amorces | Séquences (5'-3') | T _m °C | Allèles (pb) | Références |
|---------|---------------------------|-------------------|--------------|---------------------------------|
| F1f | GACAAGCAAGCGATAGGAAA | 51 | 183-191 | Giraud <i>et al.</i> (2002) |
| F1r | GTTTCTTGATAGCACGGACCGACG | | | |
| F3f | CATATTCAACCGACCCACAA | 53 | 192-335 | » |
| F3r | GTTTTTGAATGATAAGGGCGACGG | | | |
| F4f | CTTTTTCCCGGCTCCATTTT | 53 | 131-139 | » |
| F4r | GTTTGCTTTCCTGCTCGATCGGG | | | |
| F6f | TATTCGTGCAAGGACTTGG | 51 | 111-138 | » |
| F6r | GTTTCTTGGTCCCTGGATATCGAA | | | |
| F7f | TGACAAGCAAGCGATAGGAA | 52 | 230-236 | » |
| F7r | GTTTGAGTGGAGTTTCGATATCGC | | | |
| F9f | CGAGCTAATGGTGGCAGGAT | 50 | 182-226 | » |
| F9r | GTTTAACACCAAAACGGCTCATCG | | | |
| F10f | AAGCGCCAACAGAGATGACGA | 55 | 91-204 | » |
| F10r | GTTTGACTGCCGAAACACCGAAA | | | |
| F11f | CAGTCTTGGTCGCTCATCAG | 55 | 311-331 | » |
| F11r | GTTTCAGGTTGGCACGCTTCTTAA | | | |
| HK1043f | ACAGGCATCCAAGGACATTT | 58 | 214-245 | Suga <i>et al.</i> (2004) |
| HK1043r | GTTTGTTTGATGGCGCATTCAAAG | | | |
| SSR24f | CGGACATCTTCACCTGGTCC | 65 | 117-161 | Vogelgsang <i>et al.</i> (2009) |
| SSR24r | GTTTGCCGCGAATACAGAGTGCTC | | | |
| SSR23f | GTTGACACAGAAGAATGGCAGG | 65 | | » |
| SSR23r | GTTTCGCTAGGTACAAATTGCTGGG | | | |

III.3.3. Analyse des données des SSR

Le niveau de diversité des 4 populations définies par rapport à l'origine géographique des isolats (Algérie, Australie, Italie et États-Unis) a été calculé à l'aide d'une analyse hiérarchique de la variance moléculaire (AMOVA) réalisée par le logiciel GenAlEx (Peakall et Smouse, 2012). Il s'agit d'une analyse hiérarchique de la variance dont les hypothèses sont testées par des tests de permutation (999 permutations). Cette analyse exige la spécification des groupes d'individus et l'assignement de chaque individu à une population au sein des groupes. Les paramètres de variabilité génétique tels que l'indice de différenciation (ϕ_{PT}), le nombre d'allèles obtenus, le nombre d'allèles privés (PAS), le nombre d'allèles efficaces (N_e), l'indice de Shannon (I) et la diversité des gènes par locus (H) des populations étudiées ont été aussi estimés à l'aide du logiciel GenAlEx. Pour avoir une estimation du

flux des gènes entre les isolats appartenant aux différents pays, une estimation du nombre efficace de migrants (N_m) a été réalisée avec le même logiciel.

Une approche bayésienne a été utilisée pour déterminer le nombre le plus vraisemblable de sous populations ou “clusters” (K) génétiquement différenciés dans la population globale de *F. culmorum* étudiée et la probabilité d’assignation (q) de chaque isolat à chacune des sous populations sur la base des résultats obtenus au niveau des différents loci SSR employés. Cette approche a été appliquée en utilisant le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) suivant quatre modèles différents: modèles de mixité ou de non-mixité et fréquences alléliques corrélées ou indépendantes. Pour chaque “run”, les analyses de STRUCTURE ont été réalisées avec 100 000 itérations de chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) précédées par une phase d’allumage “Burn-in period” de 25 000 itérations. Les valeurs testées de K varient de 1 à 8. Dix simulations sont effectuées pour chaque valeur de K . STRUCTURE estime la probabilité d’un jeu de données pour un K donné en effectuant des simulations (MCMC). La distribution obtenue est appelée log vraisemblance “log likelihood” [$L(K)$]. Le nombre le plus plausible de clusters (K) a été antérieurement identifié en se référant à la plus forte valeur de $L(K)$ calculée par STRUCTURE. Cependant, cette distribution ne montre pas un mode assez clair qui puisse permettre la détermination du nombre de clusters le plus probable (Pritchard *et al.*, 2000). Pour cela, le nombre de clusters les plus vraisemblables (K) dans notre population a été défini par la méthode d’Evanno *et al.* (2005). Cette méthode consiste donc à calculer le taux de changement de second ordre de la courbe logarithme du log vraisemblance entre des K successifs (ΔK) pour détecter les clusters les plus vraisemblables. K est généralement identifié en se référant à la plus forte valeur de ΔK (Evanno *et al.*, 2005).

Le logiciel STRUCTURE HARVESTER (Earl et Vonholdt, 2012) a été utilisé pour évaluer le taux de variation de ΔK afin de choisir le modèle optimal qui maximise le ΔK sur la base de la méthode d’Evanno *et al.* (2005) et sélectionner la meilleure estimation de K . Des estimations du log vraisemblance ont été également calculées pour des valeurs de K allant de 1 à 8 avec 10 répétitions.

Après l’analyse de la structure de la population par le logiciel STRUCTURE où $K = 2$ a été déterminé comme la meilleure estimation de K suivant la méthode d’Evanno *et al.* (2005), tous les paramètres de la variabilité génétique ont été recalculés entre les deux sous populations obtenues (clusters) à l’aide du logiciel GenAlEx. Le déséquilibre de liaison a été déterminé pour les deux clusters définis par l’analyse de la structure de la population en calculant l’indice d’association ($\bar{r}d$) par le logiciel R package *poppr* avec 999 permutations (Kamvar *et al.*, 2014). En outre, tous ces paramètres de diversité génétiques ont été également calculés pour la population algérienne.

III.4. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE DES ISOLATS DE *F. CULMORUM*

L'effet d'une gamme de températures (5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35°C) sur la croissance mycélienne des 139 isolats algériens de *F. culmorum* a été évalué *in vitro* suivant le protocole établi par Ward *et al.* (2008). Les isolats de *F. culmorum* ont été cultivés dans un premier temps sur un milieu PDA pendant 7 jours à une température comprise entre 20 et 22°C dans une chambre de culture sous une lumière blanche continue. Des explants mycéliens de 6 mm de diamètre prélevés à partir de ces cultures à l'aide d'un emporte-pièce sont déposés chacun au centre d'une boîte de Petri de 8,6 cm de diamètre contenant le milieu PDA. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque isolat et pour chaque température.

Afin de déterminer le diamètre moyen de la croissance mycélienne des colonies des isolats de *F. culmorum*, le logiciel IMAGEJ a été utilisé pour effectuer des mesures quotidiennes de la croissance mycélienne radiale après 24, 48, 72 et 96 h d'incubation.

Une analyse de la variance à un seul facteur des résultats de l'étude de l'effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *F. culmorum* a été réalisée par le logiciel Statistica v.6. pour chaque température.

III.5. ÉTUDE DE L'AGRESSIVITÉ DES ISOLATS DE *F. CULMORUM* SUR COLLET ET ÉPI DU BLÉ

L'agressivité d'une collection d'isolats algériens de *F. culmorum* a été étudiée sur deux variétés l'une de blé dur (Vitron), l'autre de blé tendre (HD 1220). Ces deux variétés sont les plus couramment cultivées en Algérie. Les semences utilisées durant cette étude proviennent de la station de l'ITGC d'Oued Smar (El Harrach). L'inoculation artificielle de ces deux variétés par les isolats de *F. culmorum* a été réalisée sur collet et sur épi.

III.5.1. Évaluation de l'agressivité des isolats de *F. culmorum* sur collet

Le degré d'agressivité d'une collection de 139 isolats de *F. culmorum* isolés à partir des collets et des épis de blé durant les campagnes agricoles 2013-2014 et 2014-2015 a été évalué sur collet de blé selon le protocole de Hajieghrari (2009) qui consiste en une inoculation directe du sol par des explants mycéliens au moment du semis. Cette technique a été choisie en raison de sa simplicité, de sa fiabilité et de sa rapidité vu qu'elle ne nécessite pas une préparation préalable de l'inoculum, en outre, elle est bien adaptée pour les tests utilisant un grand nombre d'isolats.

Les graines de blé ont été préalablement désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min, puis rincées dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile et séchées sur du papier Joseph stérile. Par la suite, les graines ont été semées à raison de 5 graines par pot, à une profondeur de 3 cm environ dans des pots contenant un mélange de 2/3 de terre et un 1/3 de terreau préalablement stérilisé. À partir de cultures de *F. culmorum* âgées de 7 jours, on prélève cinq explants mycéliens de 6 mm de diamètre que l'on dépose dans chaque pot à quelques mm de chaque graine. L'ensemble explant mycélien et graines sont ensuite recouverts par le sol. Un témoin négatif consistant en un sol inoculé par des explants d'agar stérile a été réalisé. Trois répétitions consistant en 2 pots ont été effectuées pour le témoin et pour chaque isolat de *F. culmorum*. Les pots ont été répartis aléatoirement dans la serre.

Les notations des symptômes ont été effectuées au stade 3 feuilles, soit 35 jours après le semis. Après arrachage, les plantules ont été lavées sous l'eau du robinet pour éliminer les particules du sol. La sévérité de la maladie a été évaluée par le pourcentage de brunissement du collet selon l'échelle de notation à 4 degrés de Grey et Mathre (1984):

0 = Absence de symptôme

1 = Brunissement de 1-25% de la surface du collet

2 = Brunissement de 26-50% de la surface du collet

3 = Brunissement de plus de 50% de la surface du collet

L'indice de maladie est calculé par la formule suivante :

$$IM = (0 \times F0 + 1 \times F1 + 2 \times F2 + 3 \times F3)/N$$

où:

IM = Indice de maladie

F = Nombre de plants pour chaque degré dans l'échelle de notation de 0 à 3

N = Nombre total de plants utilisés

Une analyse de la variance à deux facteurs des résultats de l'agressivité des isolats de *F. culmorum* sur collets de la variété Vitron et HD 1220 a été réalisée par le logiciel Statistica v.6.

III.5.2. Évaluation de l'agressivité des isolats de *F. culmorum* sur épi

L'évaluation de l'agressivité des isolats de *F. culmorum* sur épi a été réalisée sur deux campagnes successives au niveau de deux sites différents: ferme centrale de l'ENSA (2014-2015) et station expérimentale de l'ENSA (2015-2016). Les deux essais ont été réalisés en blocs aléatoires complets.

L'essai conduit au niveau de la ferme centrale de l'ENSA en 2014-2015 a été réalisé sur une parcelle ayant une superficie de 1243 m². Le précédent cultural de cette parcelle est l'orge. Un ensemble de 56 isolats de *F. culmorum* isolés en 2014 à partir du collet et de l'épi représentatifs des différentes wilayas prospectées ont été testés sur les épis. Le semis a été réalisé le 19 décembre 2014.

L'essai conduit au niveau de la station expérimentale de l'ENSA en 2015-2016 a été effectué sur une parcelle de 429 m² dont le précédent cultural est une jachère. Un ensemble de 19 isolats sélectionnés sur la base des résultats de l'étude de la structure génétique ont été testés sur les épis. Les isolats sélectionnés sont représentatifs des différents chémotypes, des mating types et des clusters. Le semis a été réalisé le 19 décembre 2015.

Des microparcelles de 1 m² (1 x 1 m) espacées de 1 m² (1 x 1 m) ont été délimitées après le labour et la préparation du lit de semence. Chaque microparcelle comporte 5 lignes de semis séparées l'une de l'autre par une distance de 25 cm (Fig. 11A). Trois microparcelles ont été utilisées pour chaque isolat ainsi que pour le témoin négatif. Dans chaque microparcelle 300 graines environ de chaque variété ont été semées manuellement. Trois désherbages manuels ainsi qu'un programme de fertilisation ont été effectués au cours des deux essais.

L'inoculation artificielle a été réalisée par pulvérisation d'une suspension de spores de *F. culmorum* au stade floraison selon le protocole établi par Gosman *et al.* (2010) (Fig. 11B). Cette technique d'inoculation est largement utilisée pour l'évaluation de l'agressivité des différentes espèces de *Fusarium* sur céréales ainsi que pour la sélection des cultivars résistants à la fusariose de l'épi. À partir de culture de *F. culmorum* sur milieu SNA âgées de 10 jours, une suspension de spores de chaque isolat a été préparée. Les concentrations en spores des suspensions ont été déterminées à l'aide d'une cellule Malassez. Ces concentrations ont été ensuite ajustées à 10⁵ conidies/mL. Lors de l'inoculation, une goutte de Tween 20 (0,01%) a été ajoutée à chaque suspension pour assurer une dispersion uniforme des conidies.

Au stade floraison, les trois lignes intérieures de chaque microparcelle ont été inoculées par pulvérisation de 200 mL de la suspension de spores. Le témoin négatif a été pulvérisé par 200 mL d'eau distillée stérile. Une irrigation par aspersion a été réalisée 30 min avant l'inoculation et pendant dix jours afin de maintenir une humidité relative élevée nécessaire aux premiers stades de développement du champignon. Les notations des symptômes ont été réalisées sur 50 épis selon une échelle de 9 degrés, 21 jours après l'inoculation (Tableau 8) (Chrpová *et al.*, 2010). Les épis ont été récoltés à maturité puis égrainés de manière à récupérer la totalité des grains y compris ceux momifiés. À partir des épis de chaque microparcelle, mille grains ont été prélevés et pesés afin de déterminer leur poids de

mille grains (PMG). L'effet de la maladie sur le rendement a été ensuite évalué par le PMG des épis inoculés comparés à ceux du témoin.



Figure 11 Essai *in situ*. A. Vue du dispositif expérimental. B. Stade d'inoculation (floraison).

Tableau 8 Échelle de notation des symptômes sur épi (Chrprová *et al.*, 2010).

| Degrés | Pourcentages d'épis infectés | Symptômes |
|--------|------------------------------|---|
| 1 | 0% | Aucun symptôme |
| 2 | 5-17% | Dessèchement d'un épillet sur épi |
| 3 | 18-30% | Dessèchement de plus de 18% des épillets de chaque épi |
| 4 | 31-43% | Dessèchement d'un quart des épillets de chaque épi |
| 5 | 44-56% | Dessèchement de la moitié des épillets de chaque épi |
| 6 | 57-69% | Dessèchement de trois quarts des épillets de chaque épi |
| 7 | 70-82% | Dessèchement de plus de 70% des épillets de chaque épi |
| 8 | 83-95% | Peu d'épillets d'un épi ne sont pas desséchés |
| 9 | >95% | Tous les épillets sont desséchés |

L'indice de maladie est calculé par la formule suivante (Isebaert *et al.*, 2009):

$$IM = (1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4 + 5 \times n5 + 6 \times n6 + 7 \times n7 + 8 \times n8 + 9 \times n9) / N \times 100\%$$

où :

IM = Indice de maladie

n = Nombre d'épis pour chaque degré dans l'échelle de notation de 1 à 9

N = Nombre total d'épis

Une analyse de la variance à deux facteurs des résultats de l'agressivité des isolats de *F. culmorum* sur épis de la variété Vitron et HD 1220 a été réalisée par le logiciel Statistica v.6. La corrélation entre l'agressivité des isolats sur épi (les indices de la maladie) et leurs pourcentages de réductions du PMG a été évaluée par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson par le même logiciel.

Résultats

IV. RÉSULTATS

IV.1. IDENTIFICATION DES AGENTS RESPONSABLES DE LA POURRITURE DU COLLET ET DE LA FUSARIOSE DE L'ÉPI DU BLÉ EN ALGÉRIE

IV.1.1. Collecte des échantillons

Les prospections réalisées dans 30 wilayas durant les deux campagnes céréalières 2013-2014 et 2014-2015 ont confirmé la présence de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé en Algérie. Lors de ces prospections, on remarque dans certains champs la présence de plages constituées par des épis échaudés suite à une pourriture du collet (Fig. 12A). La fréquence et la superficie de ces plages diffèrent d'un champ à un autre. Les symptômes observés au niveau de ces plages consistent en un dessèchement total des épis accompagné d'un brunissement du collet (Fig. 12A-E). Dans le cas de la fusariose de l'épi, on remarque un dessèchement partiel ou total des épis (Fig. 12F). Des amas de sporodochies roses ou oranges sont le plus souvent observés au niveau des épillets (Fig. 12F).

Sur 500 champs de blé prospectés, 424 d'entre eux sont infestés par les agents causaux de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi. Par ailleurs, la présence de la pourriture du collet a été constatée dans 28 wilayas alors que la fusariose de l'épi a été observée dans 17 sur les 30 prospectées. La majorité des wilayas où des attaques de la fusariose de l'épi ont été constatées, appartiennent aux étages bioclimatiques subhumide et humide de l'est et du centre du pays (Fig. 13). La prévalence de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi varie d'un champ à un autre et d'une wilaya à l'autre. Ces deux maladies n'ont pas été observées au niveau des champs prospectés dans les wilayas de Tébessa et de Khenchla, cependant, ceci n'exclut pas leur présence dans d'autres localités de ces deux wilayas (Fig. 13).

IV.1.2. Isolements, purification par monospore et conservation

Afin d'identifier les agents causaux de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi, des isolements ont été réalisés à partir des organes présentant les symptômes typiques de ces deux affections. Après isolement et purification des colonies, une collection de 416 isolats associés avec la pourriture du collet et la fusariose de l'épi a été obtenue (Tableau 9).



Figure 12 Symptômes de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé observés lors des prospections. A. Plages d'épis de blé desséchés (Oued El Othmánya, Mila, 2014). B-C. Épis de blé desséchés (Oued El Othmánya, Mila en 2015). D. Épis de blé échaudés. E. Pourriture du collet (El Khroub, Constantine, 2014). F. Amas de sporodochies sur des épis atteints par la fusariose de l'épi (Hmer El Aïn, Tipaza, 2015).

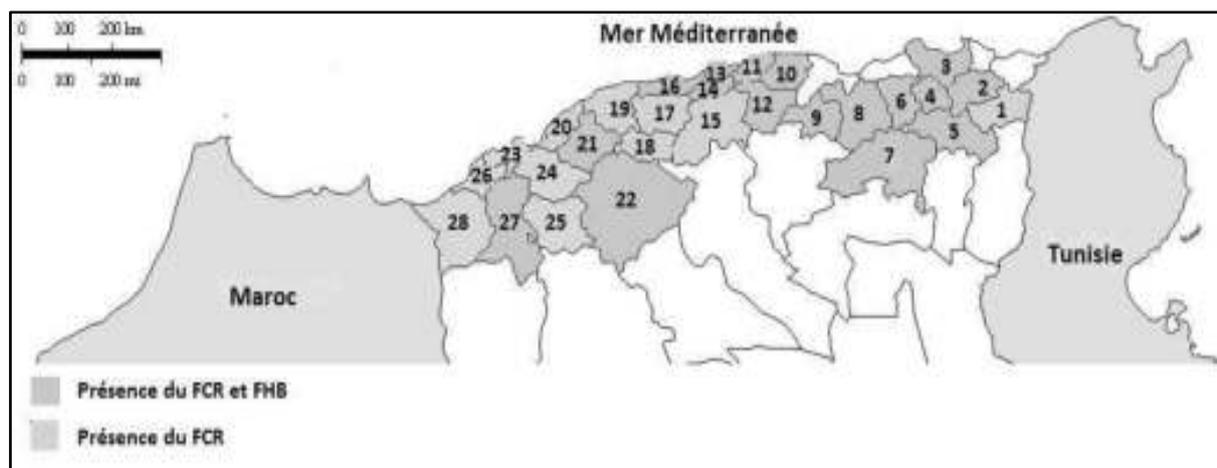


Figure 13 Répartition géographique de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé en Algérie. 1. Souk Ahrass. 2. Guelma. 3. Skikda. 4. Constantine. 5. Oum El Bouaghi. 6. Mila. 7. Batna. 8. Sétif. 9. Bordj Bou Arreridj. 10. Tizi Ouzou. 11. Boumerdès. 12. Bouira. 13. Alger. 14. Blida. 15. Médéa. 16. Tipaza. 17. Ain Defla. 18. Tissemsilt. 19. Chlef. 20. Mostaganem. 21. Relizane. 22. Tiaret. 23. Oran. 24. Mascara. 25. Saida. 26. Ain Témouchent. 27. Sidi Bel Abbés. 28. Tlemcen.

IV.1.3. Identification morphologique des isolats

L'identification morphologique des isolats a révélé la présence de deux genres fongiques: *Fusarium* et *Microdochium*. La quasi-totalité des isolats semble appartenir au genre *Fusarium* où plusieurs espèces ont été morphologiquement identifiées: *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. cerealis*, etc. Cependant, plusieurs isolats n'ont pas pu être morphologiquement identifiés. C'est pour cette raison que l'identification morphologique a été complétée par une caractérisation moléculaire des isolats. En outre, plusieurs genres saprophytes ont été fréquemment isolés comme *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., etc.

IV.1.4. Identification moléculaire des isolats

IV.1.4.1. Identification moléculaire des isolats de *Fusarium* spp. par séquençage du gène *TEF1-α*

Le séquençage d'une portion du *TEF1-α* des isolats appartenant au genre *Fusarium* a permis de distinguer 11 espèces. Les séquences obtenues ont été comparées à celles disponibles dans Genbank de NCBI et *Fusarium MLST*. Les pourcentages de similarité entre les séquences de nos isolats avec celles compatibles de NCBI et de *Fusarium MLST* varient de 98% à 100%. Les résultats de cette identification moléculaire ont révélé que l'espèce *F. culmorum* est la plus répandue en Algérie (139 isolats), suivie par *F. pseudograminearum* (36 isolats) (Figs. 14 et 15, Tableau 9). Les codes des iso-

lats identifiés, les années d'isolement, les espèces ainsi que leurs origines géographiques sont indiqués dans l'annexe 3.

Le séquençage des isolats originaires d'Australie, d'Italie et des États-Unis a également confirmé leur appartenance à l'espèce *F. culmorum*. Les séquences partielles du gène *TEF1-α* de 190 isolats de l'espèce *F. culmorum* générées au cours de cette étude ont été déposées dans GenBank de NCBI sous les numéros d'accès KY873384-KY873574. L'analyse des séquences des isolats de *F. culmorum* alignées avec le logiciel Seaview a révélé qu'elles étaient semblables à 99,3%.



Figure 14 Résultat du BLASTn de l'isolat IL 291 dans GenBank de NCBI.

Fusarium culmorum isolate Lapeni 10 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds
Sequence ID: MG195126.1 Length: 432 Number of Matches: 1

| Score | Expect | Identical | Gaps | Strand |
|---------------|--|---------------|-----------|------------|
| 798 bits(432) | 0.0 | 432/432(100%) | 0/432(0%) | Plus/Minus |
| Query: 1 | ACTGATTSACACGTGATGCTGCTCCCTTAGGGAATGTTTGTGGAAGAGGCGACGCC | 88 | | |
| Subject: 444 | ACTGATTSACACGTGATGCTGCTCCCTTAGGGAATGTTTGTGGAAGAGGCGACGCC | 388 | | |
| Query: 44 | TGTCGTCGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG | 120 | | |
| Subject: 384 | TGTCGTCGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG | 320 | | |
| Query: 132 | TTTACCTCGAGCGGGTACACAGCCGCTATCGATGCTGCTGTTGAGGCGATTCGATG | 288 | | |
| Subject: 324 | TTTACCTCGAGCGGGTACACAGCCGCTATCGATGCTGCTGTTGAGGCGATTCGATG | 288 | | |
| Query: 180 | ATGTTTCSAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG | 240 | | |
| Subject: 288 | ATGTTTCSAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG | 288 | | |
| Query: 342 | CTCGATGTTGCTTTGTCGATACCACTCCACTGATGATGATGATGATGATGATGATG | 300 | | |
| Subject: 284 | CTCGATGTTGCTTTGTCGATACCACTCCACTGATGATGATGATGATGATGATGATG | 242 | | |
| Query: 381 | TATGTCACACATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTG | 360 | | |
| Subject: 184 | TATGTCACACATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTG | 89 | | |
| Query: 361 | GTGATCTACACATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTG | 420 | | |
| Subject: 84 | GTGATCTACACATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTG | 23 | | |
| Query: 422 | TGATCTTTGCTC 432 | | | |
| Subject: 24 | TGATCTTTGCTC 13 | | | |

Figure 15 Alignement de la séquence de l'isolat IL 291 (Query) avec la séquence de la souche MG195126.1.

Tableau 9 Les espèces de *Fusarium* identifiées à partir du collet et de l'épi.

| Espèces | Collet | Épi |
|-----------------------------|--------|-----|
| <i>F. acuminatum</i> | 4 | 0 |
| <i>F. avenaceum</i> | 5 | 0 |
| <i>F. brachygibbosum</i> | 3 | 4 |
| <i>F. cerealis</i> | 1 | 0 |
| <i>F. culmorum</i> | 115 | 24 |
| <i>F. nygamai</i> | 3 | 0 |
| <i>F. oxysporum</i> | 8 | 3 |
| <i>F. pseudograminearum</i> | 33 | 3 |
| <i>F. redolens</i> | 4 | 2 |
| <i>F. tricinctum</i> | 3 | 0 |
| FIESC | 36 | 19 |
| <i>Fusarium</i> sp. | 10 | 0 |

IV.1.4.2. Identification moléculaire de *Microdochium* spp. par PCR

L'identification moléculaire des isolats appartenant au genre *Microdochium* a été réalisée par PCR en utilisant des amorces spécifiques des espèces *M. nivale* et *M. majus*. Les couples d'amorces utilisés ont amplifié des bandes de 310 pb (chez 16 isolats) et de 750 pb (chez 4 isolats) respectivement spécifiques des espèces *M. nivale* et *M. majus* (Fig. 16). Les souches de référence utilisées comme témoin positif ont confirmé ce résultat. Par ailleurs, aucune bande n'a été observée chez le témoin négatif (Fig. 16) (Annexe 3).

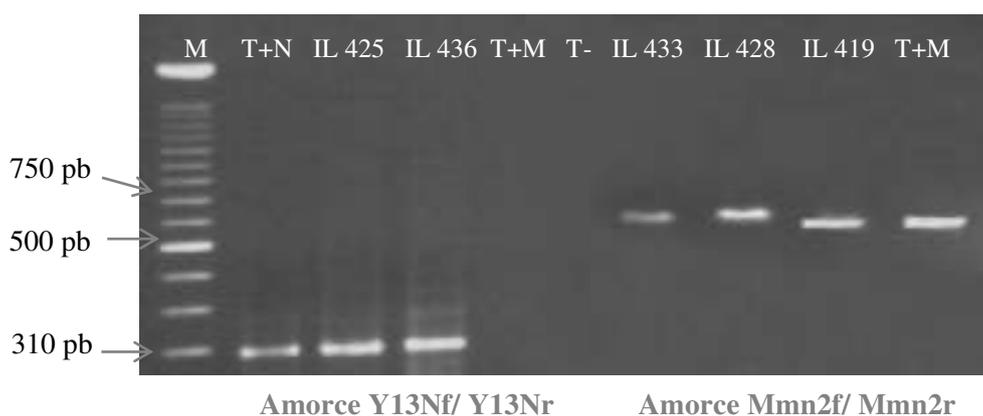


Figure 16 Profil de migration des produits d'amplification sur gel d'agarose. M: marqueur. T+N: témoin positif (la souche 169). Lignes 3, 4, 7-9: les isolats amplifiés. T+M: témoin positif (la souche 167). T-: eau pure.

IV.1.5. Description morphologique des espèces identifiées

Les caractéristiques culturales des espèces observées sur milieu PDA et celles microscopiques étudiées sur les milieux SNA et CLA sont indiquées ci-dessous.

F. culmorum

Sur milieu PDA, les isolats de *F. culmorum* montrent des colonies dont le mycélium est aérien, abondant et de couleur blanche avec des reflets jaunes, marrons ou roses. Tous les isolats de cette espèce ont une croissance rapide et diffusent le plus souvent un pigment rose à rouge dans l'agar. La plupart des isolats produisent des sporodochies de couleur orange pâle (Figs. 17A et 20A, C). Les macroconidies courtes, épaisses, droites à légèrement arquées avec une cellule apicale arrondie et une cellule basale pas nettement pédicellée présentent 3 à 5 cloisons transversales (Fig. 21A-B). Sur les cultures âgées, on remarque la présence des chlamydospores qui se forment sur les hyphes ou sur les macroconidies. Chez cette espèce, les microconidies sont absentes.

F. pseudograminearum

Sur milieu PDA, les colonies de *F. pseudograminearum* sont floconneuses et présentent un mycélium aérien de couleur blanche qui vire avec l'âge vers le jaune, le rose ou le marron. Les isolats de cette espèce diffusent un pigment rose à rouge dans le milieu de culture (Fig. 17B). Les macroconidies qui présentent habituellement 3 à 6 cloisons sont minces, longues, légèrement arquées à presque droites, pourvues d'une cellule apicale allongée et d'une cellule basale pédicellée (Fig. 21C-D). Les chlamydospores sont abondantes (Fig. 21E). Les microconidies sont absentes chez cette espèce.

Le complexe d'espèces *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC)

Sur milieu PDA, la majorité des isolats appartenant à ces espèces montrent des colonies oranges à roses claires dont le mycélium est aérien et épars (Fig. 17C). Certains isolats ont des colonies floconneuses et pulvérulentes (Fig. 17D). Des sporodochies crèmes sont souvent produites en abondance (Fig. 17C-D). Les macroconidies arquées, relativement larges au centre et très minces aux extrémités, pourvues de 4 à 7 cloisons présentent une cellule basale pédicellée et une apicale effilée (Fig. 22C-D). Chez ces espèces, les microconidies sont absentes.

F. oxysporum

Sur milieu PDA, les colonies de cette espèce présentent des aspects morphologiques très variables. Le mycélium dense ou épars montre une coloration variant du blanc au violet. Les isolats de cette es-

pèce produisent généralement un pigment violet à noir dans l'agar (Fig. 17E). Les macroconidies légèrement arquées à presque droites sont habituellement pourvues de 3 cloisons. La cellule apicale de ces macroconidies est courbée alors que celle basale est pointue et bien développée (Fig. 22B). Les microconidies ovales, ellipsoïdales ou réniformes sont souvent monocellulaires (Fig. 22B).

F. brachygibbosum

Sur milieu PDA, cette espèce montre des colonies blanches, crèmes à roses claires avec un mycélium aérien abondant rose sur lequel des taches jaunes apparaissent généralement au bout du 7^{ème} jour d'incubation (Fig. 17F). Les macroconidies incurvées et pourvues de 3 à 5 cloisons présentent une cellule centrale large, une apicale légèrement aiguë et une basale pédicellée (Fig. 23A-C). Les chlamydospores intercalaires ou terminales, solitaires ou en chaîne sont observées sur les hyphes et sur les macroconidies (Fig. 23A-C). Les microconidies sont absentes chez cette espèce.

F. avenaceum

Cette espèce présente sur milieu PDA des colonies ayant un mycélium abondant. Ces colonies montrent habituellement des cercles concentriques de différentes couleurs (jaune clair, blanc et rose grisâtre) et une pigmentation de couleur rose-grisâtre à rouge (Fig. 18A). Les isolats de cette espèce sont caractérisés par une croissance lente. Des sporodochies orange-pâle à marrons sont produites en abondance au centre des colonies (Fig. 18A). Les macroconidies qui présentent 3 à 5 cloisons transversales sont droites à légèrement arquées, longues, minces avec une cellule apicale longue et effilée et une basale nettement pédicellée (Fig. 22A). Les microconidies et les chlamydospores sont absentes chez cette espèce.

F. acuminatum

Sur milieu PDA, les isolats de cette espèce montrent un mycélium aérien plus au moins abondant de couleur blanche à rose saumon. Une pigmentation rose saumon est généralement observée dans la gélose (Fig. 18B). Les macroconidies arquées, pourvues d'une cellule basale bien développée et une apicale relativement allongée montrent 3 à 5 cloisons. Les microconidies sont absentes chez la majorité des isolats étudiés, cependant quelques-uns produisent en abondance des microconidies mono et bicellulaires (Fig. 23D-E).

F. redolens

Sur milieu PDA, les colonies de cette espèce montrent un mycélium ras, blanc à rose. Les isolats

de *F. redolens* diffusent un pigment brun dans la gélose (Fig. 18C). Les macroconidies épaisses, arquées, pourvues de 4 à 5 cloisons transversales présentent une cellule apicale crochue et une basale pédicellée (Fig. 22E, F). Les chlamydospores sont produites en abondance (Fig. 22G). Les microconidies sont absentes chez cette espèce.

F. nygamai

Les isolats de cette espèce sur milieu PDA présentent un mycélium initialement blanc, qui vire avec l'âge vers le violet (Fig. 18D). Ces isolats diffusent un pigment violet dans l'agar. Les macroconidies produites dans des sporodochies oranges sont courtes, minces, presque droites, pourvues habituellement de 3 cloisons et présentent une cellule apicale petite et conique et une basale bien distincte (Figs. 20B, D et 23G). Les microconidies sont petites, monocellulaires, ovales à ellipsoïdales (Fig. 23G).

F. tricinctum

Les isolats de cette espèce montrent sur milieu PDA un mycélium dense, abondant, initialement blanc qui vire avec l'âge vers le rose, le rouge ou le violet. Les isolats de *F. tricinctum* produisent un pigment saumon dans l'agar (Fig. 18E). Les macroconidies nettement arquées, relativement minces pourvues de 3 à 5 cloisons montrent une cellule apicale courbée à effilée et une basale en forme de pied (Fig. 21F). Les microconidies ovales, réniformes, monocellulaires ou bicellulaires sont produites abondamment par cette espèce (Fig. 21F).

***F. cerealis* (Syn. *F. crookwellense*)**

Les colonies de *F. cerealis* se développent plus au moins lentement avec un mycélium aérien, épars, blanc à violet. Les isolats produisent des pigments violets à rouges dans l'agar (Fig. 18F). Les macroconidies épaisses, pourvues de 3 à 5 cloisons montrent un côté ventral presque droit et un côté dorsale fortement courbé. Les cellules apicales de ces macroconidies sont effilées alors que celles basales sont bien développées (Fig. 23F). Les microconidies sont absentes chez cette espèce.

M. nivale* et *M. majus

Les colonies de ces espèces de couleur blanche à orange claire présentent souvent un mycélium ras, parfois légèrement aérien, dense ou feutré. Des sporodochies oranges, groupées ou parfois dispersées sont très souvent présentes à la périphérie des colonies (Fig. 19A). Les conidies mono ou bicellulaires sont falciformes et présentent un sommet pointu et une base arrondie (Fig. 19B).

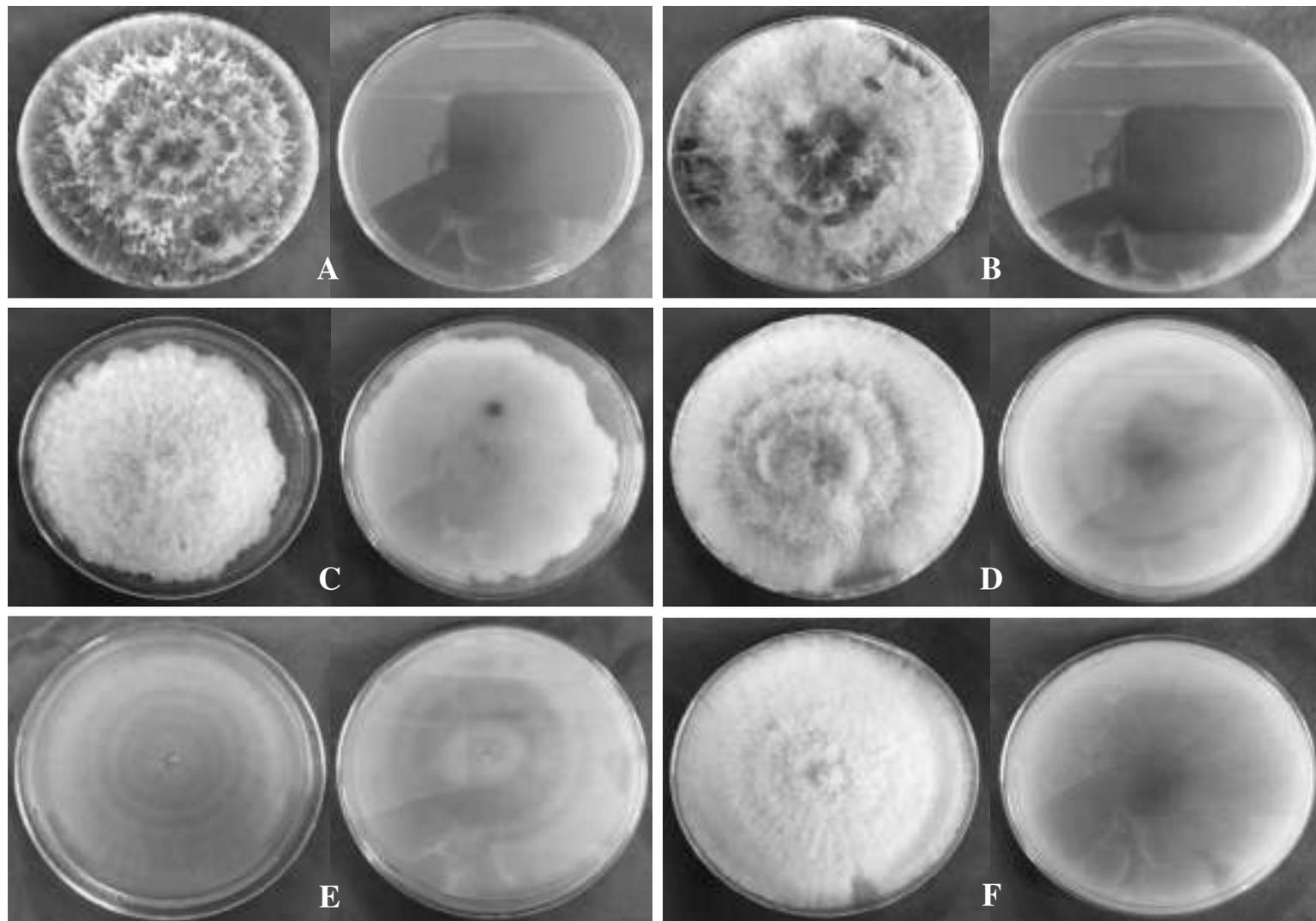


Figure 17 Aspect cultural des espèces identifiées sur milieu PDA. A. *F. culmorum*. B. *F. pseudograminearum*. C-D. *FIESC*. E. *F. oxysporum*. F. *F. brachygibbosum*.

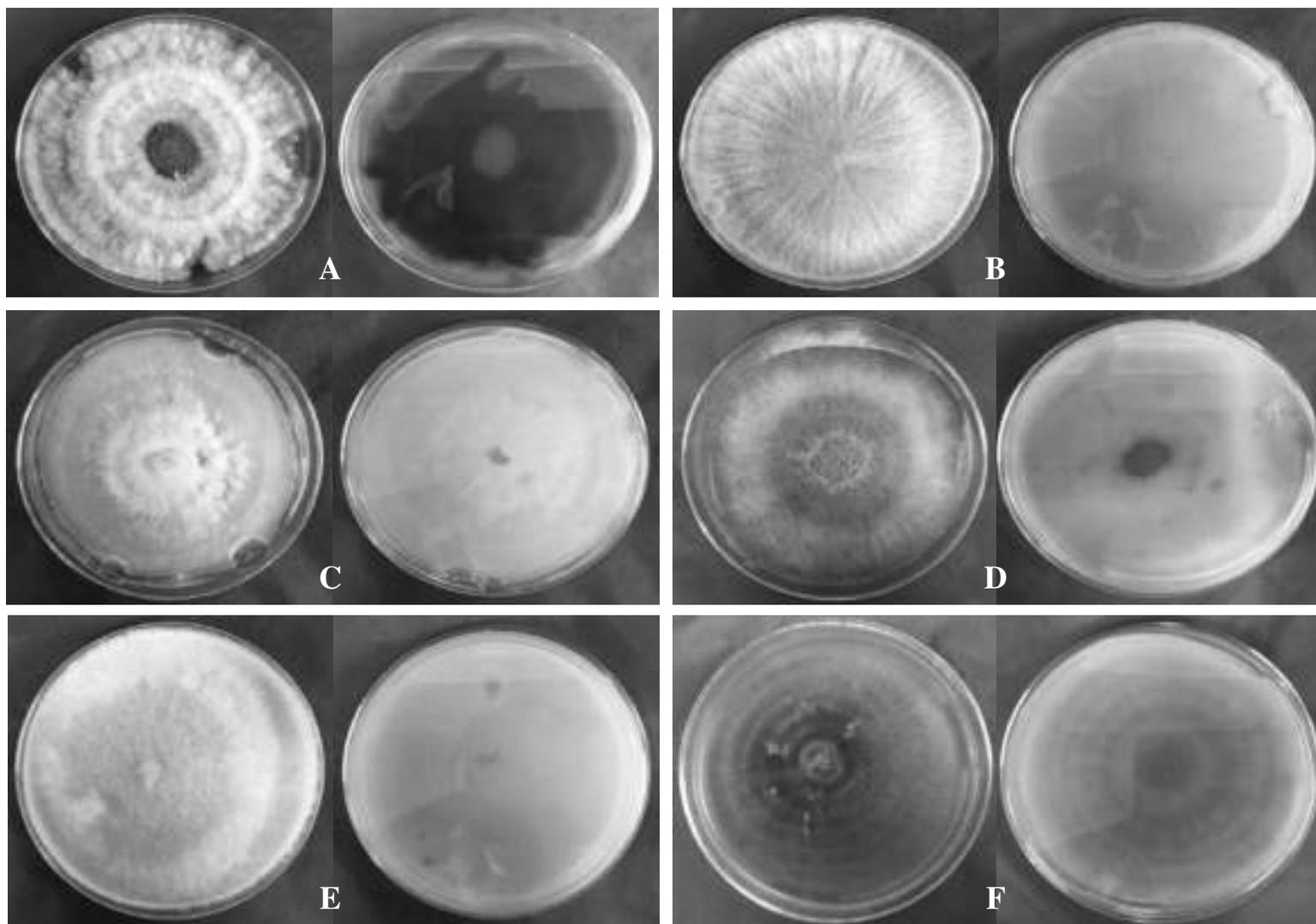


Figure 18 Aspect cultural des espèces identifiées sur milieu PDA. A. *F. avenaceum*. B. *F. acuminatum*. C. *F. redolens*. D. *F. nygamai*. E. *F. tricinctum*. F. *F. cerealis*.

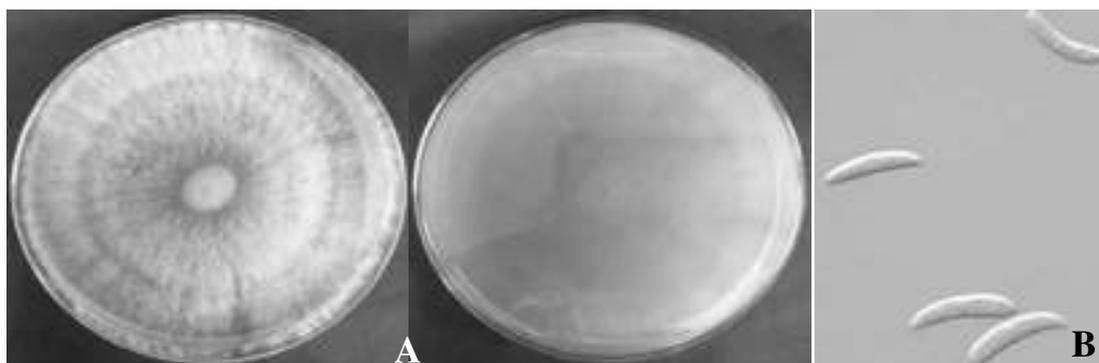


Figure 19 Aspect cultural et microscopique de *M. nivale* et de *M. majus*. A. Aspect cultural des colonies sur milieu PDA. B. Conidies de *M. nivale* observées en contraste interférentiel différentiel (CID) (Gx400).

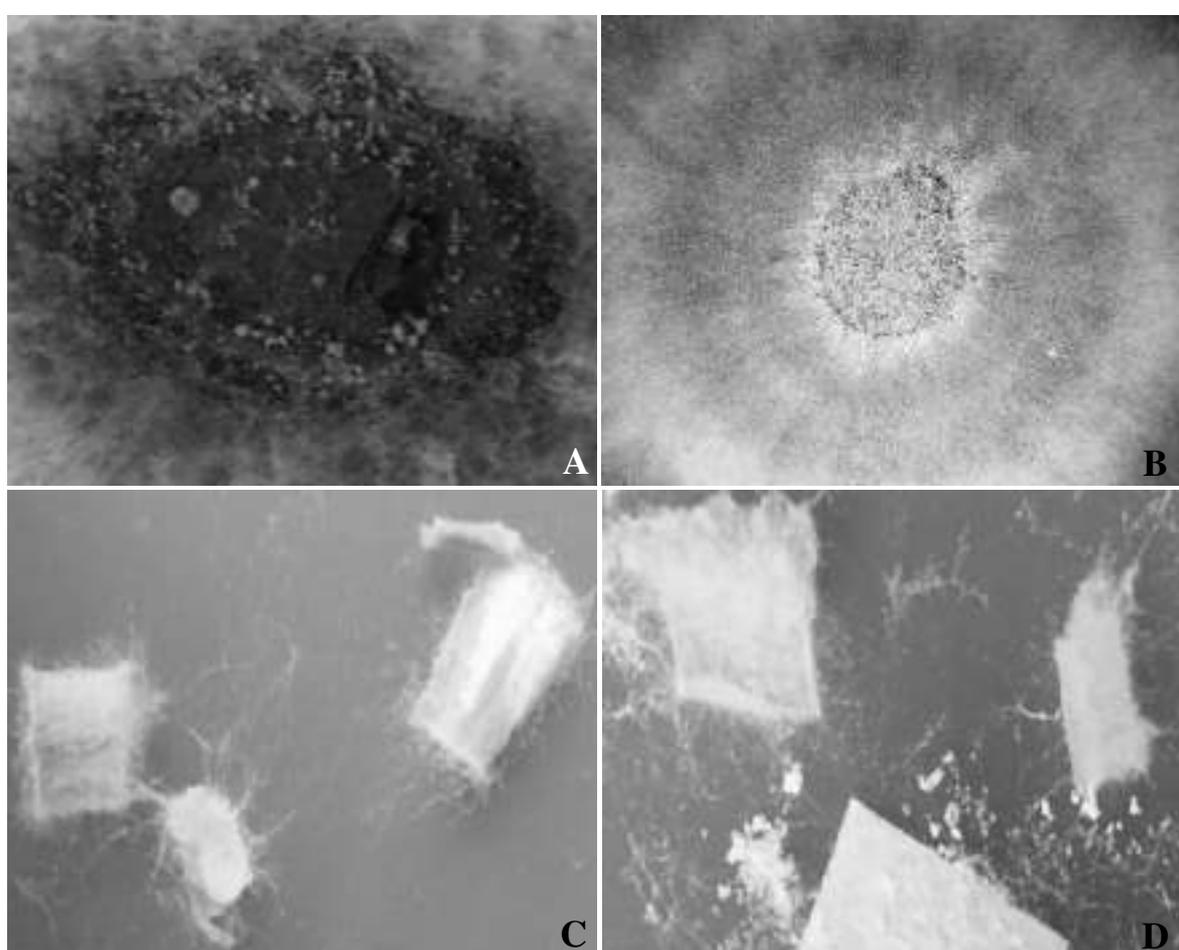


Figure 20 Aspect des sporodochies produites sur milieux PDA et CLA. A. Sporodochies de *F. culmorum* produites sur milieu PDA. B. Sporodochies de *F. nygamai* produites sur milieu PDA. C. Sporodochies de *F. culmorum* produites sur milieu CLA. D. Sporodochies de *F. nygamai* produites sur milieu CLA.

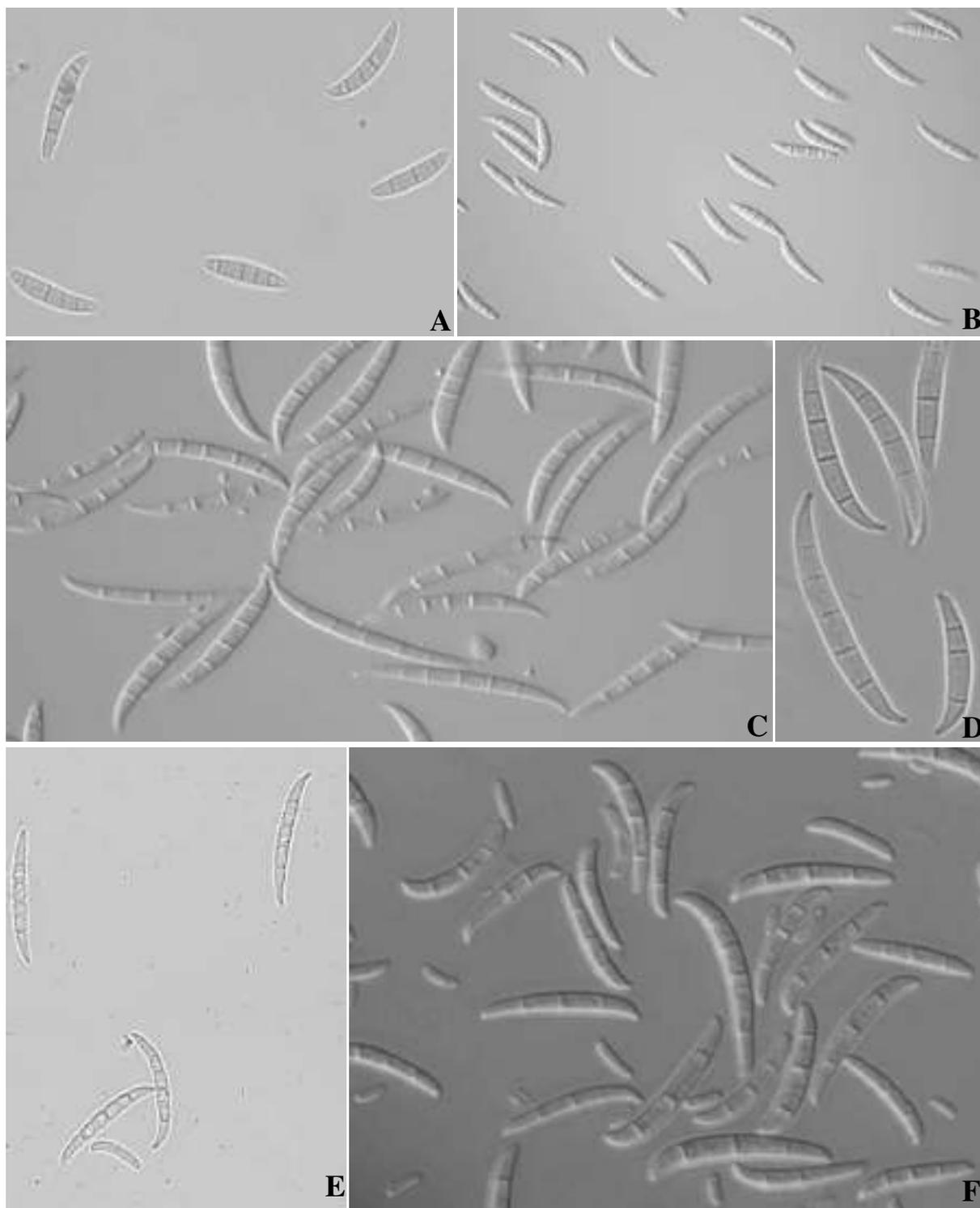


Figure 21 Aspect microscopique des espèces identifiées sur milieux SNA et CLA (Gx400). A. Macroconidies de *F. culmorum* observées en contraste de phase (Ph). B. Macroconidies de *F. culmorum* (CID). C. Macroconidies de *F. pseudograminearum* (CID). D. Macroconidies de *F. pseudograminearum* (Ph). E. Chlamydospores sur les macroconidies de *F. pseudograminearum* (Ph). F. Macro et microconidies de *F. tricinctum* (CID).

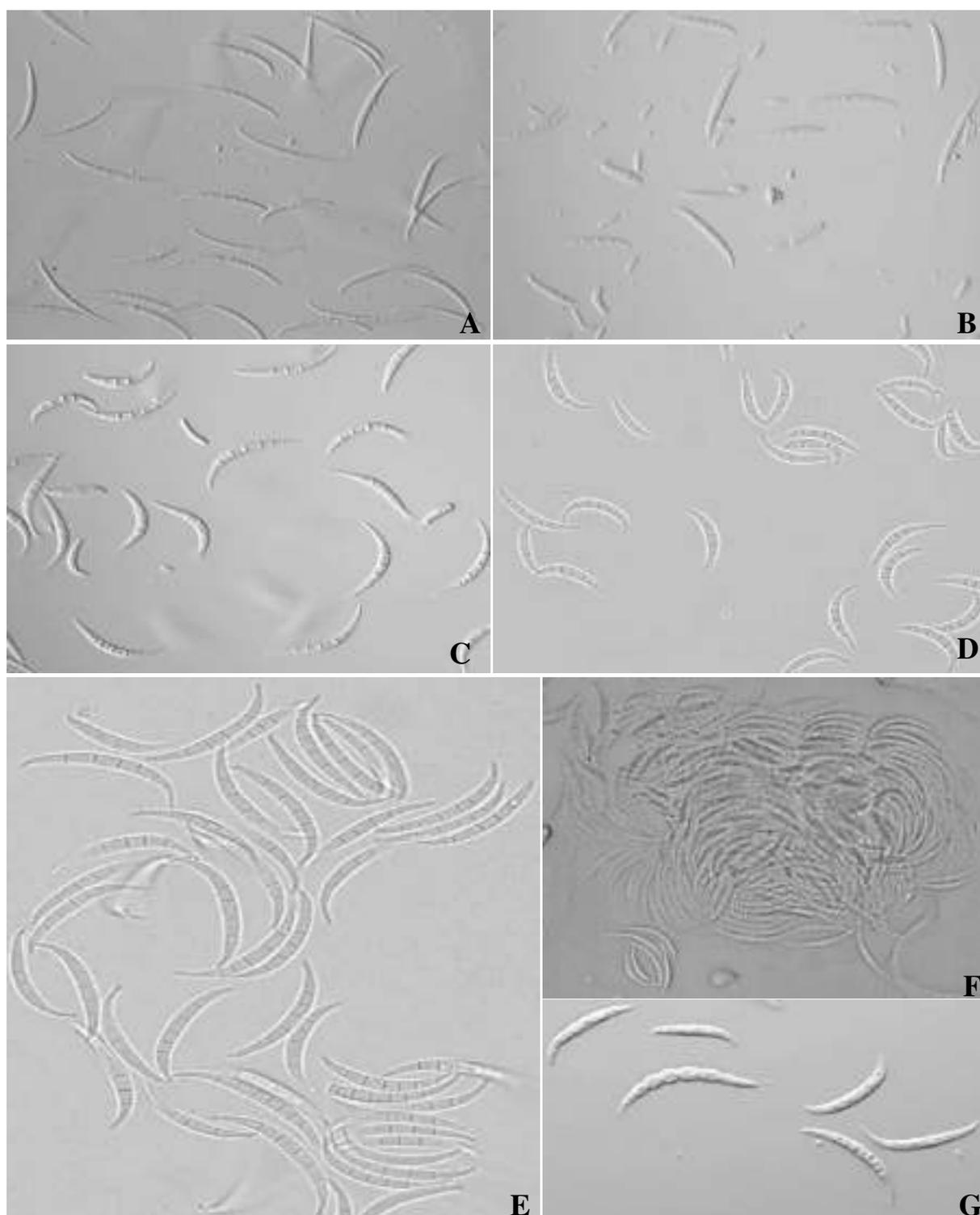


Figure 22 Aspect microscopique des espèces identifiées sur milieux SNA et CLA. A. Macroconidies de *F. avenaceum* (CID, Gx200). B. Macro et microconidies de *F. oxysporum* (CID, Gx200). C. Macroconidies de *FIESC* (CID, Gx200). D. Macroconidies de *FIESC* (Ph, Gx200). E. Macroconidies de *F. redolens* (Ph, Gx400). F. Sporodochie de *F. redolens* (Ph, Gx200). G. Chlamydospores formées sur les macroconidies de *F. redolens* (CID, Gx200).

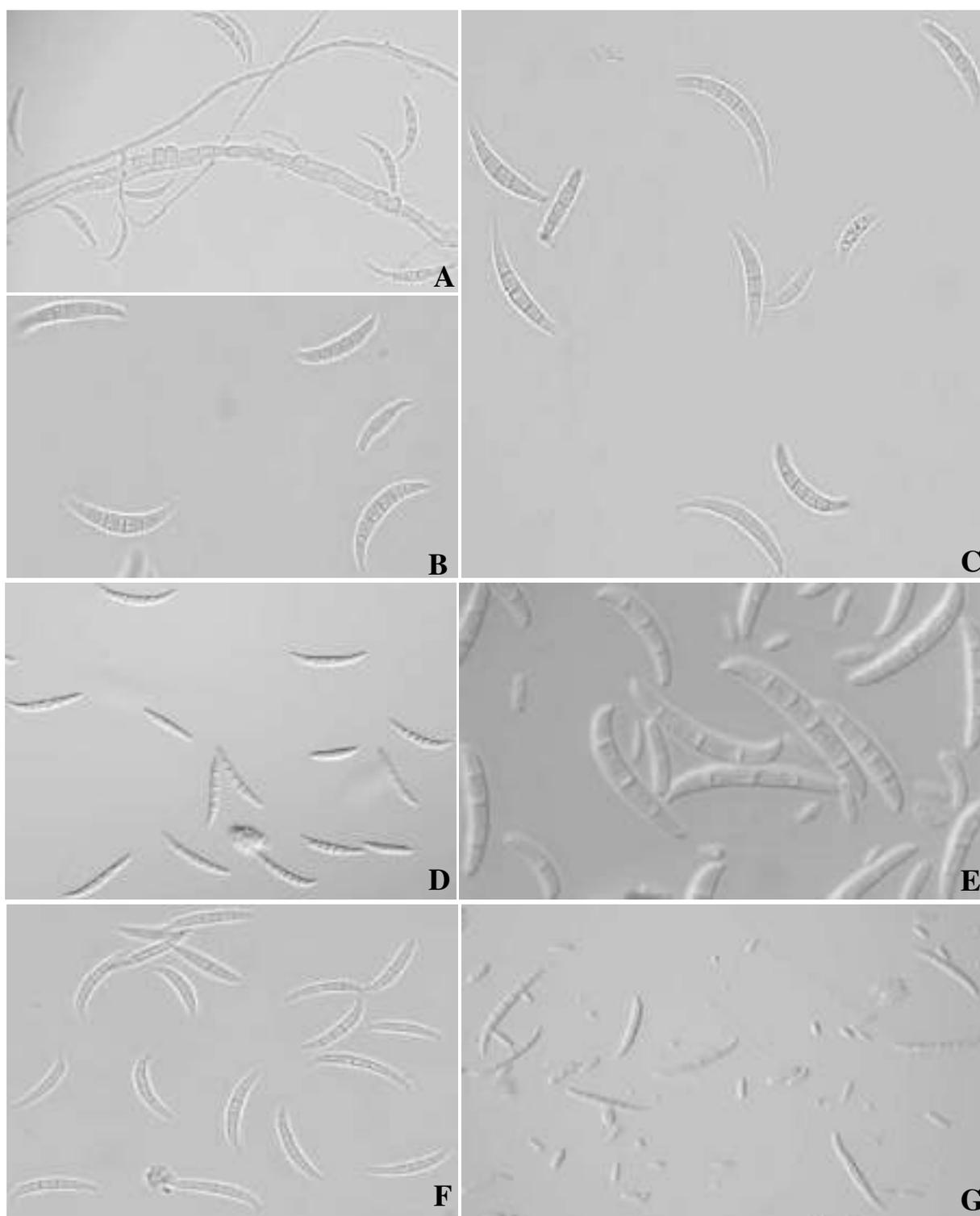


Figure 23 Aspect microscopique des espèces identifiées sur milieux SNA et CLA. A. Chlamydospores de *F. brachygibbosum* (Ph, Gx200). B-C. Chlamydospores et macroconidies de *F. brachygibbosum* (Ph, Gx400). D. Macroconidies de *F. acuminatum* (CID, Gx200). E. Micro et Macroconidies de *F. acuminatum* (Ph, GX400). F. Macroconidies de *F. cerealis* (Ph, Gx200). G. Micro et macroconidies de *F. nygamai* (CID, Gx200).

IV.2. POUVOIR TOXINOGENÈNE DES ISOLATS DE *F. CULMORUM*

IV.2.1. Détermination du chémotype des isolats de *F. culmorum* par ASO PCR

Le chémotype des isolats de *F. culmorum* provenant des quatre pays (Algérie, Australie, Italie et États-Unis) a été déterminé par ASO PCR en utilisant des amorces spécifiques des deux gènes *Tri3* et *Tri12* impliqués dans la production des trichothécènes. Les résultats de cette amplification ont révélé que sur l'ensemble des 231 isolats caractérisés, 192 (83%) ont produit un amplicon de 243 pb avec la série d'amorces spécifiques du gène *Tri3* et de 410 pb avec les amorces spécifiques du gène *Tri12* (Figs. 24 et 25). Ceci signifie que ces isolats sont du chémotype 3ADON. Chez le reste des isolats (39), des fragments de 840 pb correspondant au chémotype NIV ont été amplifiés par les deux séries d'amorces (Figs. 24 et 25). Les fragments de 610 pb ou de 670 pb spécifiques du chémotype 15ADON n'ont pas été détectés dans cette collection de *F. culmorum*. Les bandes observées chez les souches de référence utilisées comme témoin positif (TN, T3 et T15) ont confirmé ce résultat (Fig. 25). Par ailleurs, aucune bande n'a été observée chez le témoin négatif (Figs. 24 et 25).

Une différence significative ($\chi^2 = 16,02-62,22$, ddl = 1, $P = 0,0003-0,0001$) dans la fréquence des deux chémotypes a été notée au sein des populations provenant d'Algérie (116 3ADON:23 NIV), d'Australie (28 3ADON:5 NIV) et des États-Unis (29 3ADON:1 NIV) où on remarque une dominance du chémotype 3ADON. En revanche, en Italie (19 3ADON:10 NIV) le ratio n'est pas significativement différent de 1:1 ($\chi^2 = 2,78$, ddl = 1, $P = 0,26$). Les résultats de la détermination des chémotypes des isolats étudiés sont indiqués dans l'annexe 4.



Figure 24 Profil de migration sur gel d'agarose des produits de l'amplification par les amorces spécifiques du gène *Tri3*. M: marqueur de poids moléculaire. 2 à 68: les isolats de *F. culmorum*. T-: témoin négatif (eau ultra pure).



Figure 25 Profil de migration sur gel d'agarose des produits de l'amplification par les amorces spécifiques du gène *Tri12*. M: marqueur de poids moléculaire. 1 à 100: les isolats de *F. culmorum*. TN: témoin positif (NRRL 34640). T3: témoin positif (NRRL 34189). T15: témoin positif (NRRL 37458). T-: eau ultra pure.

IV.2.2. Détermination du potentiel toxigène des isolats de *F. culmorum* sur milieu liquide par GC-MS

Après la détermination des chémotypes par ASO PCR, la capacité des isolats de *F. culmorum* originaires d'Algérie à produire *in vitro* les trichothécènes (déoxynivalénol et nivalénol) et la culmorine a été mesurée sur un milieu liquide à base d'agmatine par GC-MS. La quantification des trichothécènes a montré que sur les 134 isolats testés, 80 ont produit le 3ADON à des niveaux détectables et 18 ont exhibé un pic de production de NIV (Fig. 26A-E). Ceci confirme les résultats obtenus par ASO PCR. Il est important de noter que ces 98 isolats producteurs du 3ADON et du NIV ont également produit la culmorine (Fig. 26A-E) (Annexe 5). Celle-ci a été aussi produite par 15 isolats chez lesquels aucune production du 3ADON ou du NIV n'a été détectée (Annexe 5). Par ailleurs, 21 isolats de *F. culmorum* n'ont produit aucune de ces trois toxines sur le milieu liquide à base d'agmatine.

Les résultats obtenus ont révélé une grande variabilité entre les isolats dans les niveaux de production du 3ADON et de la culmorine. La plus faible quantité du 3ADON (8,07 µg/mL) a été notée chez l'isolat IL 302 originaire de l'épi de blé (Fig. 26A), par contre, la quantité maximale (185,32 µg/mL) a été observée chez l'isolat IL 398 obtenu également à partir d'un épi de blé (Fig. 26E). Les quantités de culmorine détectées chez ces isolats producteurs du 3ADON varient de 0,21 µg/mL (IL 167, isolé du collet) à 475,42 µg/mL (IL 278, isolé du collet) (Fig. 26A-E). Cette même toxine a été détectée chez les 18 isolats producteurs de NIV avec des concentrations variant de 0,21 µg/mL (IL 200, obtenu du collet) à 536,65 µg/mL (IL 394, obtenu du collet) (Annexe 5).

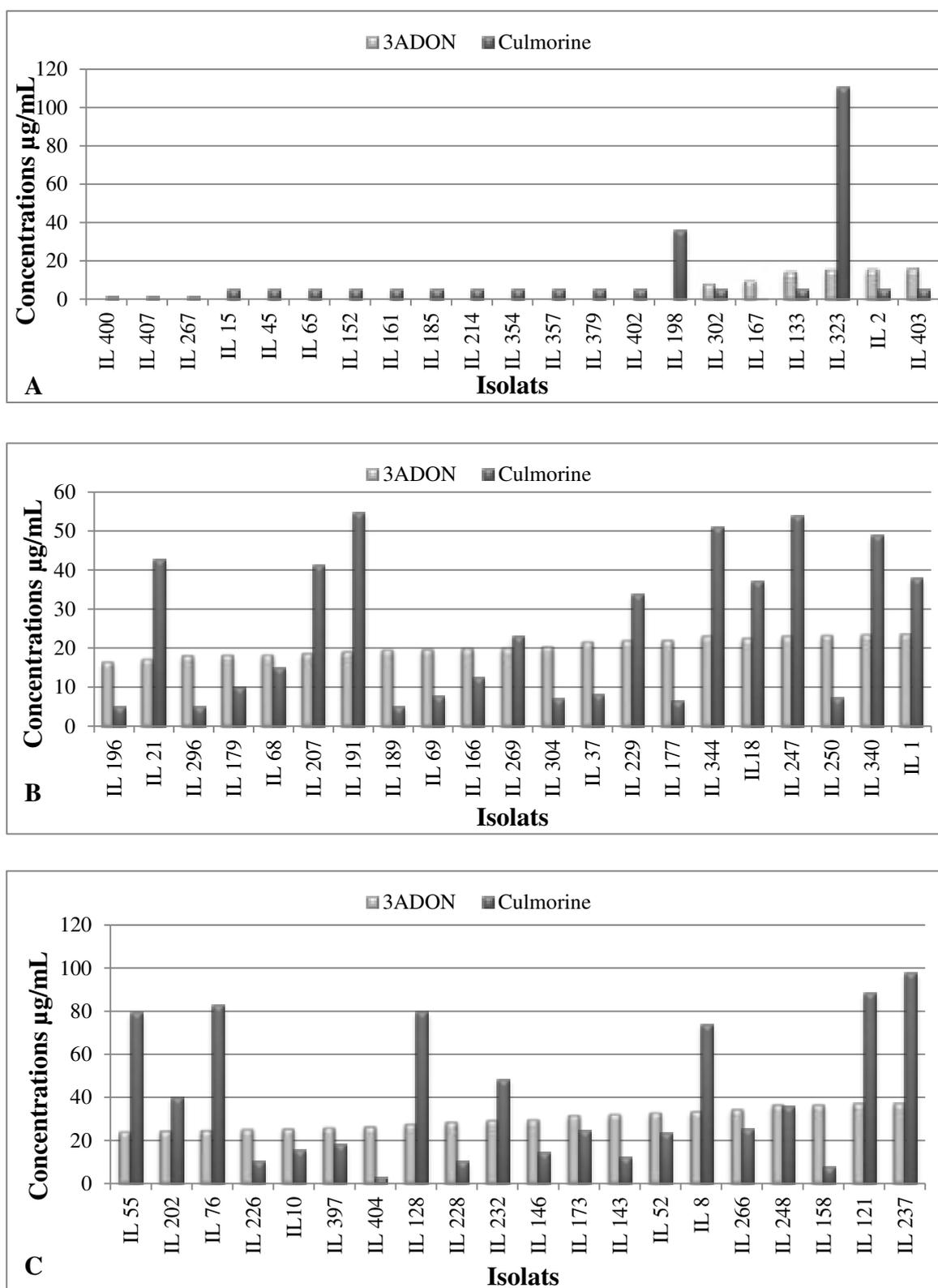


Figure 26 Concentrations de la culmorine et du 3ADON produites par les isolats de *F. culmorum* dans le milieu d'agmatine. A. Les isolats IL 400 à IL 403. B. Les isolats IL 196 à IL 1. C. Les isolats IL 55 à IL 237.

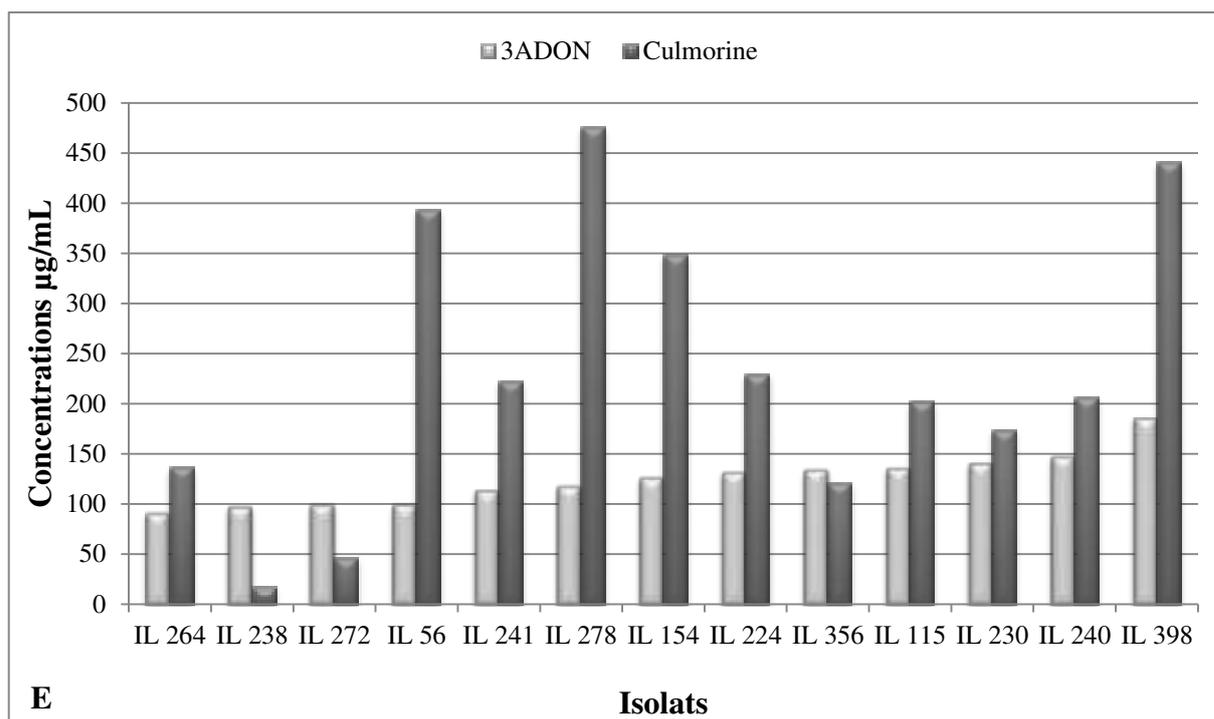
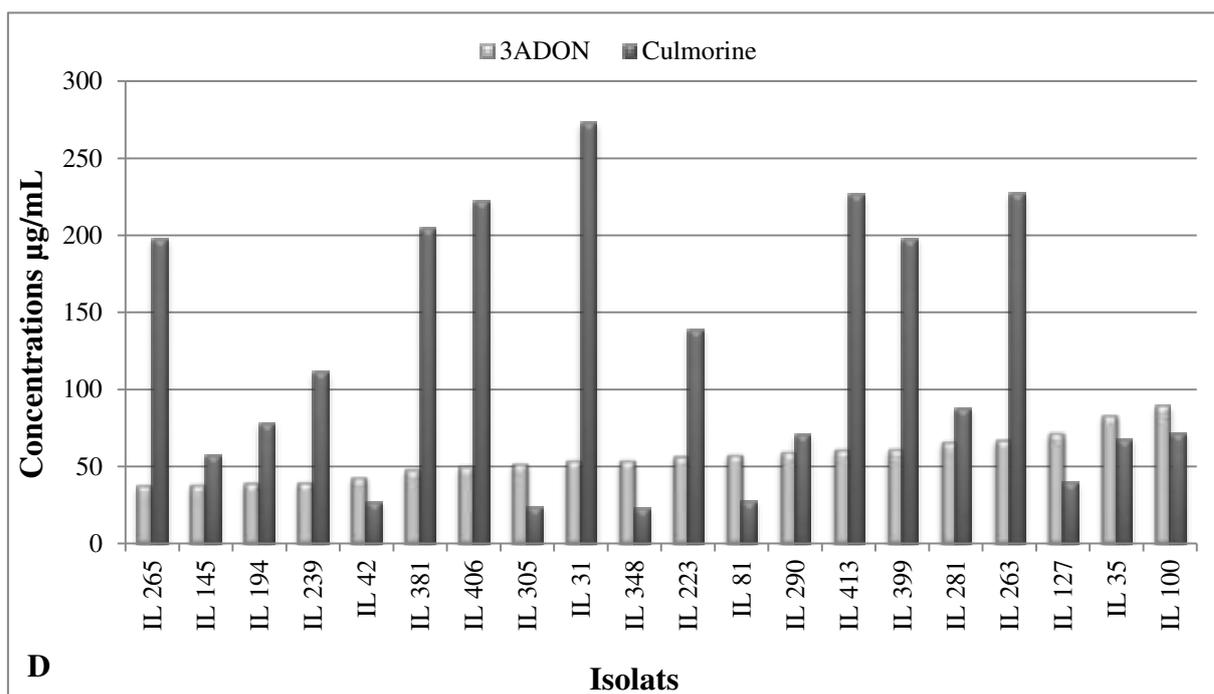


Figure 26 suite Concentrations de la culmorine et du 3ADON produites par les isolats de *F. culmorine* dans le milieu d'agmatine. D. Les isolats IL 265 à IL 100. E. Les isolats IL 264 à IL 398.

IV.2.3. Détermination du potentiel toxigène des isolats de *F. culmorum* sur graines de riz par GC-MS

Les 21 isolats de *F. culmorum* qui n'ont pas produit de trichothécènes (déoxynivalénol et nivalénol) ou de culmorine sur le milieu de culture à base d'agmatine ont été inoculés sur un substrat à base de graines de riz. Parmi ces 21 isolats, 4 ont synthétisé la culmorine (IL 13, IL 213, IL 215 et IL 217) sur ce substrat et 2 isolats ont produit le 3ADON (IL 197, IL 279) (Annexe 6). Ceci confirme les résultats obtenus par ASO PCR chez les deux isolats producteurs du 3ADON.

IV.3. STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES ISOLATS DE *F. CULMORUM*

IV.3.1. Détermination du type sexuel des isolats de *F. culmorum*

Les types sexuels des isolats de *F. culmorum* originaires d'Algérie, d'Australie, d'Italie et des États-Unis ont été déterminés par l'utilisation d'amorces spécifiques de chaque mating type. Le couple d'amorces CUL-1-f / CUL-1-r a amplifié un fragment de 200 pb spécifique de l'idiomorphe *MATI-1*, tandis que le couple d'amorces CUL-2-f / CUL-2-r a pu amplifier un amplicon de 260 pb spécifique de l'idiomorphe *MATI-2* (Fig. 27) (Kerényi *et al.*, 2004). Les bandes observées chez les témoins positifs confirment ce résultat. En outre, aucune bande n'a été observée chez le témoin négatif (Fig. 27).

Les amplifications réalisées ont révélé la présence des deux types sexuels dans les populations de *F. culmorum* de chaque pays, cependant l'idiomorphe *MATI-2* est le plus prévalent dans les quatre pays. Parmi les 231 isolats de *F. culmorum* testés, 147 isolats (64%) sont du type *MATI-2* et 84 isolats (36%) sont du type *MATI-1*.

Le ratio des types sexuels en Algérie (46 *MATI-1*:93 *MATI-2*) a été significativement différent du ratio 1:1 ($\chi^2 = 15,88$, ddl = 1, $P = 0,001$). En revanche, dans les trois autres pays les ratios ne sont pas significativement différents de 1:1: Australie (15 *MATI-1*:18 *MATI-2*), Italie (13 *MATI-1*:16 *MATI-2*) et États-Unis (10 *MATI-1*:20 *MATI-2*). Ceci ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse de reproduction sexuée dans ces pays. En outre, les résultats obtenus indiquent qu'aucun isolat de *F. culmorum* ne possède les deux idiomorphes *MATI-1* et *MATI-2* dans son génome. Les résultats de la détermination des types sexuels des isolats étudiés sont indiqués dans l'annexe 4.



Figure 27 Profil de migration sur gel d’agarose après amplification par les amorces CUL-1 et CUL-2. M: marqueur. IL 1 à IL 59: les isolats de *F. culmorum*. T+1: témoin positif pour le *MAT1-1* (NRRL 29376). T+2: témoin positif pour le *MAT1-2* (NRRL 29381). T-: témoin négatif (eau ultra pure).

IV.3.2. Diversité génétique des isolats de *F. culmorum* par les marqueurs SSR

La localisation des différents marqueurs SSR, gène de mating types et de trichotécènes utilisés lors de cette étude sur le génome des souches UK99 et KOD 1161 a montré que les marqueurs HK1043, F4, F9 et F11 sont localisés sur le chromosome 1 de *F. culmorum*, les gènes *MAT1-2* du mating type et *Tri5* de trichotécènes avec les marqueurs SSR24 et F6 sont répartis sur le chromosome 2. Par ailleurs les amorces sens des deux marqueurs F1 et F7 occupent le même locus sur le chromosome 3 et le reste des marqueurs sont localisés sur le chromosome 4 (Fig. 28).

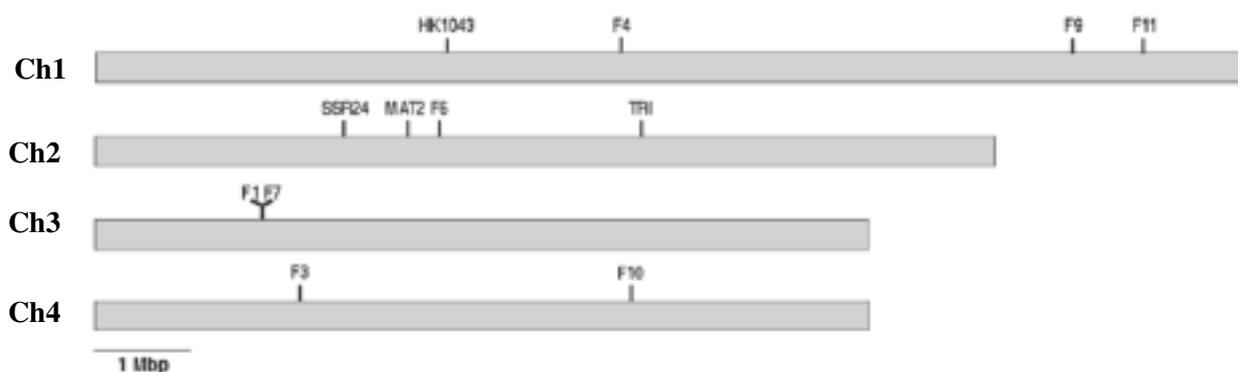


Figure 28 Localisation des 10 marqueurs SSR, du gène *MAT1-2* et du gène *Tri5* sur le génome de la souche UK99 de *F. culmorum*.

Onze marqueurs SSR ont été employés pour étudier la diversité et la structure génétique d’une population algérienne de *F. culmorum* et la comparer à trois autres populations originaires d’Australie, d’Italie et des États-Unis. Les résultats de cette étude ont révélé que le marqueur SSR23 n’a amplifié aucun allèle chez tous les isolats étudiés. Après la localisation des différents SSR sur le génome des souches UK99 et KOD 1161, on a remarqué que les marqueurs F1 et F7 partagent le même locus sur

le chromosome 3 de *F. culmorum* (cf. Fig. 28). C'est pour cela que les données générées par le marqueur F7 ont été éliminées de l'étude. En outre, les isolats chez lesquels deux allèles ou plus sont nuls (soit 40 isolats) ont été exclus de cette étude. Les données SSR collectées ont permis également de détecter 9 clones au sein des populations de *F. culmorum*: Italie (4 isolats), Algérie (3 isolats), États-Unis (1 isolat) et Australie (1 isolat). Ces 9 clones ont été aussi éliminés (Annexe 7). Après l'élimination de ces 49 isolats et des deux SSR (SSR23 et F7), les autres marqueurs utilisés ont présenté un grand polymorphisme sur l'ensemble des isolats ($n = 182$). Au sein de ces derniers, un ensemble de 135 allèles a été détecté. Le nombre d'allèles par locus varie de 3 (F1) à 35 (F10). La taille des allèles amplifiés varie de 91 à 335 pb (Annexe 8).

L'AMOVA des quatre populations définies par leurs origines géographiques a révélé que la majeure partie de la diversité génétique a été observée à l'intérieur des populations de chaque pays (89%, $P < 0,001$) alors qu'entre les populations des différents pays elle a été de l'ordre de 11% ($P < 0,001$) (Tableau 10).

Tableau 10 AMOVA des populations de *F. culmorum* d'Algérie, d'Australie, d'Italie et des États-Unis.

| Source | ddl | SC | MC | Var. Est. | % |
|---------------------|-----|---------|--------|-----------|------|
| Entre. Pops. | 3 | 45,540 | 15,180 | 0,331 | 11% |
| Inter. Pops. | 178 | 500,449 | 2,812 | 2,812 | 89% |
| Total | 181 | 545,989 | | 3,142 | 100% |

L'estimation de l'indice de différenciation (ϕ_{PT}) révèle une différenciation génétique significative entre les paires des populations des différents pays ($P < 0,001$), cependant les valeurs de ϕ_{PT} obtenues demeurent relativement faibles. En effet, elles varient de 0,06 entre les deux populations italienne et australienne à 0,13 entre celles italienne et américaine (Tableau 11).

Les calculs du nombre efficace de migrants (N_m) ont montré un flux de gènes modéré entre l'Italie et les États-Unis ($N_m = 3,34$) et élevé entre l'Italie et l'Australie ($N_m = 7,85$) (Tableau 11).

Les valeurs de l'indice de Shannon obtenues sont relativement élevées. Elles varient de 1,31 (États-Unis) à 1,57 (Algérie). La population algérienne possède le nombre d'allèles efficaces et privés les plus élevés ($N_e = 5,35$, $PAS = 35$) (Tableau 12). Ces paramètres montrent que la diversité génétique de la population algérienne est la plus élevée. Cependant, la diversité des gènes par locus la plus élevée est observée chez la population australienne ($H = 0,66$) (Tableau 12).

Tableau 11 Estimations de la différenciation génétique (ϕ_{PT} , en dessous de la diagonale) et du nombre efficace de migrants (N_m , au-dessus de la diagonale) entre les paires de populations de *F. culmorum* des quatre pays.

| Pays | Algérie | Australie | Italie | États-Unis |
|-------------------|---------|-----------|--------|------------|
| Algérie | - | 4,94 | 4,14 | 3,56 |
| Australie | 0,09 | - | 7,85 | 4,26 |
| Italie | 0,11 | 0,06 | - | 3,34 |
| États-Unis | 0,12 | 0,10 | 0,13 | - |

Tableau 12 Fréquences des chémotypes, des mating types et les indices de la diversité génétique des populations de *F. culmorum* des quatre pays.

| Pays | # Isolats | N_e^a | I^b | H^c | PAS | 3ADON | NIV | MATI-1 | MATI-2 |
|-------------------|-----------|---------|-------|-------|-----|-------|-----|--------|--------|
| Algérie | 103 | 5,35 | 1,57 | 0,6 | 35 | 89 | 14 | 34 | 69 |
| Australie | 29 | 4,18 | 1,36 | 0,66 | 4 | 25 | 4 | 11 | 18 |
| Italie | 23 | 4,53 | 1,37 | 0,63 | 3 | 17 | 6 | 12 | 11 |
| États-Unis | 27 | 4,03 | 1,31 | 0,61 | 7 | 26 | 1 | 9 | 18 |

^a N_e = Nombre d'allèles efficaces

^b I = Indice de Shannon

^c H = Diversité moyenne des gènes par locus

^d PAS = Nombre d'allèles privés

La détermination du nombre de sous populations (clusters) présent dans l'ensemble des populations étudiées ainsi que les probabilités d'assignation des isolats à chacun des clusters a été réalisée suivant quatre modèles. Selon les recommandations de Pritchard *et al.* (2000), le modèle combinant la mixité et les fréquences alléliques indépendantes a été sélectionné comme étant celui donnant les meilleurs résultats. Les simulations avec cinq clusters ($K = 5$) donnent les valeurs du log vraisemblance les plus élevées tandis que celles avec deux clusters ($K = 2$) montrent les changements du log vraisemblance les plus élevés ($\Delta K = 245,90$) et semblent capturer une structure génétique optimale (Fig. 29) (Annexe 9). En se basant sur les résultats obtenus par les quatre modèles et suivant la méthode d'Evanno *et al.* (2005), $K = 2$ a été choisi comme le nombre de clusters présent dans la population de *F. culmorum* étudiée (Fig. 30).

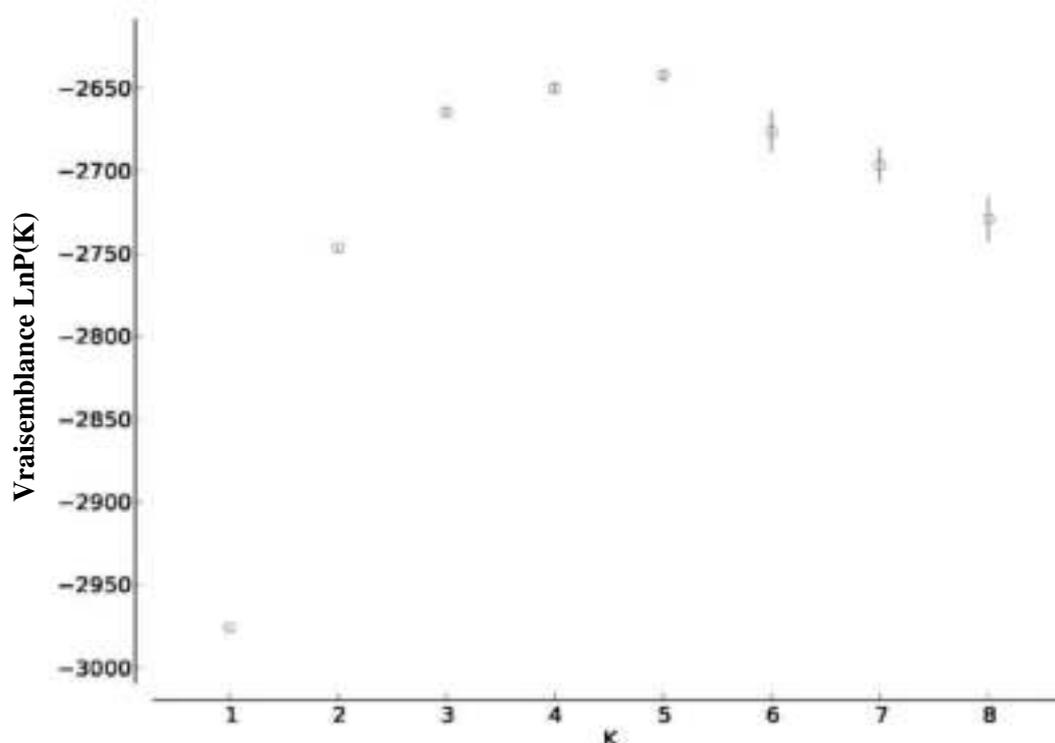


Figure 29 Représentation de la distribution du log vraisemblance avec $K = 8$. Les points représentent la moyenne du log vraisemblance $L(K)$ et les barres d'erreur correspondent à l'écart type entre les simulations.

Les résultats de l'analyse bayésienne réalisée en tenant compte de l'origine géographique des populations (Algérie, Australie, Italie et États-Unis) suivant le modèle de mixité avec des fréquences alléliques indépendantes pour des valeurs de K allant de 1 à 8 révèlent la partition de l'ensemble des isolats en 2 populations génétiques (clusters). Avec $K = 2$, on distingue deux clusters CU1 et CU2 avec des pourcentages d'isolats respectifs de 52,7% et 47,3%. Le cluster CU1 contient tous les isolats originaires des États-Unis ($n = 27$), la majorité des isolats d'Australie ($n = 28$, 79,3%), d'Italie ($n = 18$, 73,9%) et environ un quart des isolats algériens ($n = 23$, 22,3%). Le cluster CU2 regroupe la majorité des isolats d'Algérie ($n = 80$, 77,7%), cinq isolats d'Italie et un d'Australie (Figs. 30 et 31, Tableau 13). Il est également important de noter qu'à l'exception de l'isolat IL 59 tous les isolats algériens du CU1 sont soit de l'est du pays soit ils possèdent le chémotype NIV.

Les probabilités d'assignation (q) des 182 isolats à l'un des clusters CU1 ou CU2 ont été déterminées par le logiciel STRUCTURE. À l'exception de 23 isolats où q est inférieure à 0,8, tous les autres ($n = 159$) ont été assignés soit à CU1, soit à CU2 avec une probabilité d'assignation $q \geq 0,8$ (cf. Annexe 8).

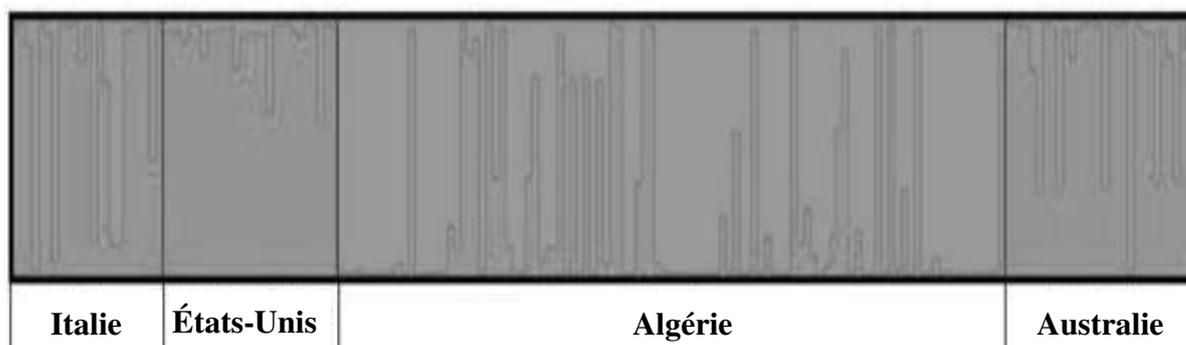


Figure 30 Structure génétique de la population de *F. culmorum* basée sur les données des 9 marqueurs SSR et déterminée par le logiciel STRUCTURE avec $K = 2$. Les clusters CU1 et CU2 sont respectivement codés par les couleurs bleu et orange. La probabilité d'assignation (q) de chaque isolat est représentée par un axe vertical. Chaque barre représente un des 182 isolats génotypés

Tableau 13 Assignation des isolats de *F. culmorum* aux populations CU1 ou CU2 par l'utilisation des 9 marqueurs SSR.

| Pays | CU1 | CU2 |
|------------|------------|------------|
| Algérie | 23 (22,3%) | 80 (77,7%) |
| Australie | 28 (96,6%) | 1 (3,4%) |
| Italie | 18 (78,3%) | 5 (21,7%) |
| États-Unis | 27 (100%) | 0 (0%) |

Une diversité génétique élevée est observée à l'intérieur des clusters CU1 et CU2 (89%, $P < 0,001$), alors qu'elle est de 11% ($P < 0,001$) seulement entre ces deux clusters (Tableau 14). L'estimation de l'indice de différenciation suggère une différenciation significative des deux clusters CU1 et CU2 ($\phi_{PT} = 0,11$, $P < 0,001$). Le calcul du nombre de migrants indique l'existence d'un flux de gènes continu entre les deux clusters ($N_m = 3,98$).

Tableau 14 AMOVA des clusters de *F. culmorum* CU1 et CU2 déterminés par le logiciel STRUCTURE.

| Source | ddl | SC | MC | Var. Est. | % |
|--------------|-----|---------|--------|-----------|------|
| Entre. Pops. | 1 | 35,366 | 35,366 | 0,359 | 11% |
| Inter. Pops. | 180 | 510,623 | 2,837 | 2,837 | 89% |
| Total | 181 | 545,989 | | 3,195 | 100% |

Les estimations de l'indice de Shannon ($I_{CU1} = 1,77$, $I_{CU2} = 1,33$), de la diversité des gènes par locus ($H_{CU1} = 0,70$, $H_{CU2} = 0,54$), du nombre d'allèles efficaces ($N_{eCU1} = 7,23$, $N_{eCU2} = 4,32$) et privés ($PAS_{CU1} = 45$, $PAS_{CU2} = 24$) mettent en évidence une diversité génétique significativement plus importante pour le cluster CU1 que pour le CU2 (Tableau 15).

Tableau 15 Fréquences des chémotypes, des mating types et les indices de la diversité génétique des clusters CU1 et CU2 de *F. culmorum* déterminés par le logiciel STRUCTURE.

| <i>K</i> | Isolats | N_e | <i>I</i> | <i>H</i> | <i>PAS</i> | 3ADON | NIV | <i>MAT1-1</i> | <i>MAT1-2</i> |
|----------|---------|-------|----------|----------|------------|-------|-----|---------------|---------------|
| CU1 | 96 | 7,23 | 1,77 | 0,7 | 45 | 74 | 22 | 37 | 59 |
| CU2 | 86 | 4,32 | 1,33 | 0,54 | 24 | 83 | 3 | 29 | 57 |

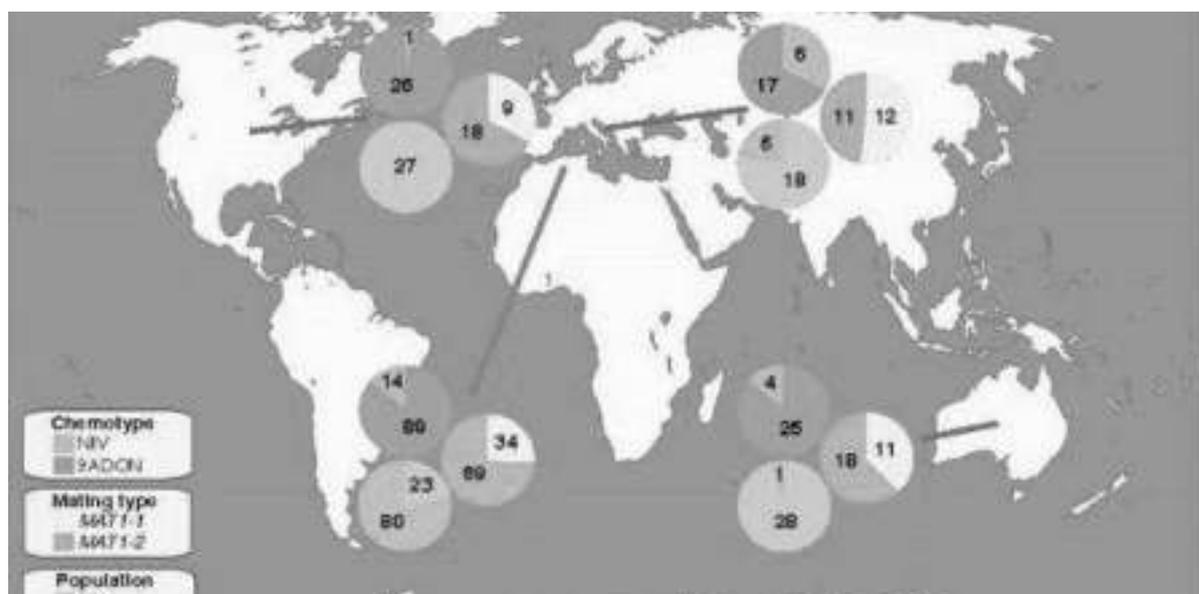


Figure 31 Distribution des chémotypes, des mating types et des clusters de *F. culmorum* dans les quatre pays (Algérie, Australie, Italie et les États-Unis).

La détermination du déséquilibre de liaison (*LD*) pour les deux clusters a révélé des valeurs modérées de l'indice d'association ($\bar{r}d$): CU1 ($\bar{r}d = 0,0294$, $P = 0,002$) et CU2 ($\bar{r}d = 0,0325$, $P = 0,001$). Ces valeurs indiquent l'existence d'un *LD* au sein des deux clusters. Afin d'évaluer si le *LD* détecté est dû à une ou plusieurs paires de loci, le $\bar{r}d$ entre les neuf marqueurs SSR a été calculé. Le *LD* le plus élevé est observé entre les marqueurs HK1043 et F1 dans la population CU1 et entre plusieurs paires de loci dans la CU2 (Fig. 33).

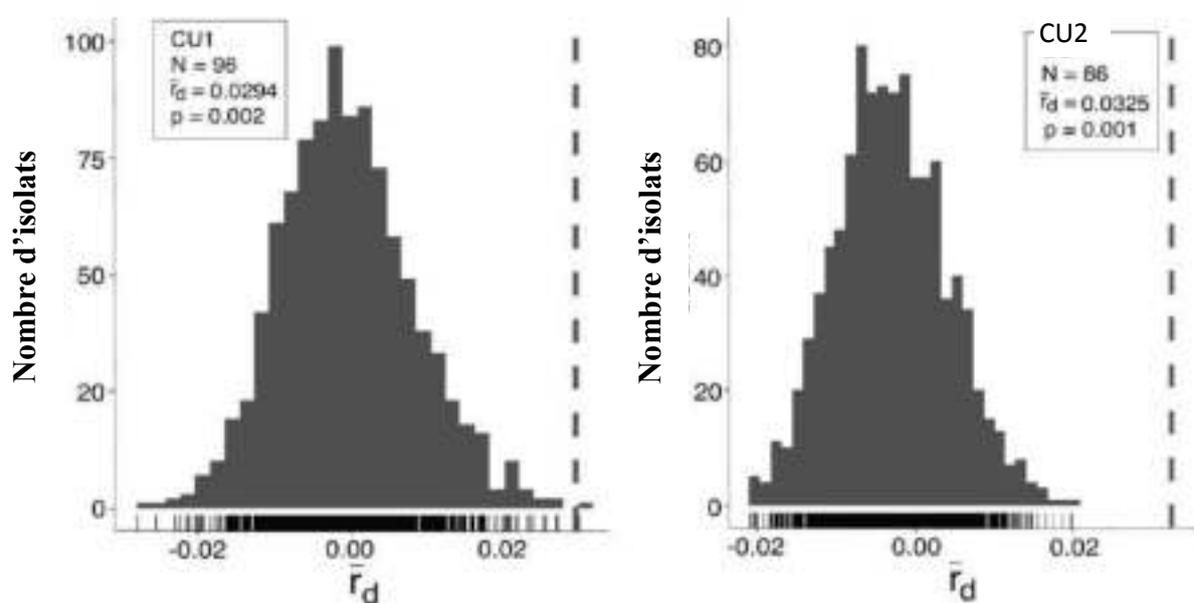


Figure 32 Indices d'association obtenus par le logiciel R package *poppr* pour les deux clusters CU1 et CU2.

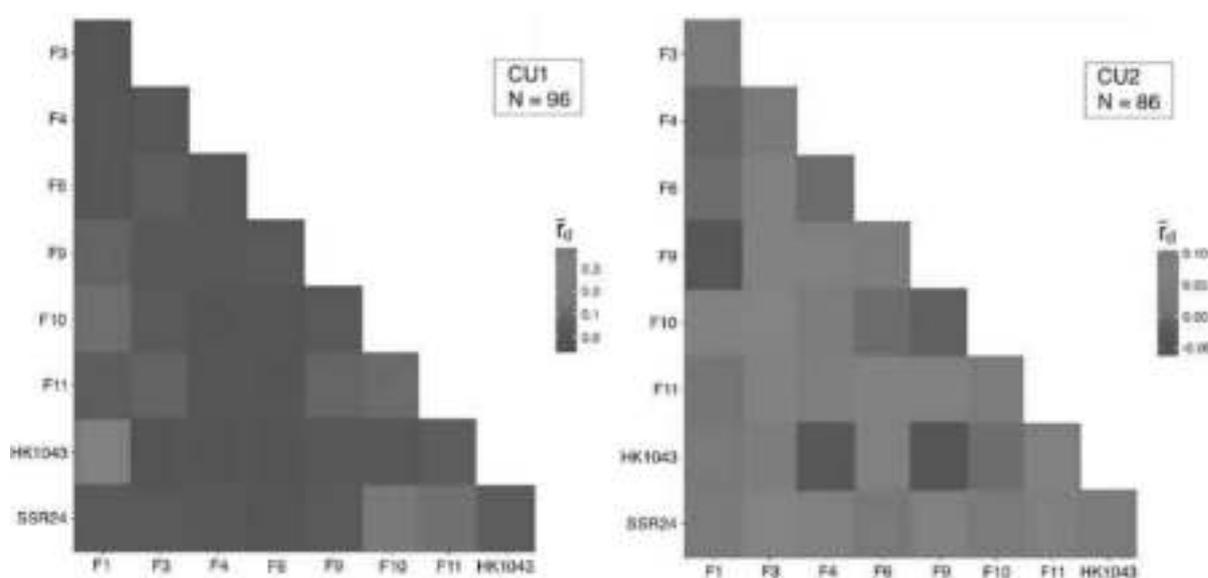


Figure 33 Indices d'association obtenus par le logiciel R package *poppr* entre les paires de loci SSR pour les deux clusters CU1 et CU2.

L'AMOVA des deux populations génétiques distinguées au sein de la population algérienne de *F. culmorum* après une analyse de la structure par le logiciel STRUCTURE avec $K = 2$ a révélé que 87% ($P < 0,001$) de la diversité génétique a été enregistrée à l'intérieur des clusters (Tableau 16).

Tableau 16 AMOVA de la population algérienne de *F. culmorum* (CU1 et CU2).

| Source | ddl | SC | MC | Var. Est. | % |
|-------------------------|-----|---------|--------|-----------|------|
| Enter. Clusters. | 1 | 16,786 | 16,786 | 0,396 | 13% |
| Intre. Clusters | 101 | 264,738 | 2,621 | 2,621 | 87% |
| Total | 102 | 281,524 | | 3,018 | 100% |

La valeur de l'indice de différenciation obtenue entre les deux clusters algériens de *F. culmorum* CU1 et CU2 ($\phi_{PT} = 0,13$) indique une différenciation génétique significative des deux clusters ($P < 0,001$). Par ailleurs, le nombre de migrants obtenu ($N_m = 3,31$) mis en évidence un flux de gènes modéré entre ces deux populations génétiques (Tableau 17).

Tableau 17 Estimations de la différenciation génétique (ϕ_{PT} , en dessous de la diagonale) et du nombre efficace de migrants (N_m , au-dessus de la diagonale) entre les deux populations génétiques définies au sein de la population algérienne de *F. culmorum*.

| Clusters | CU1 | CU2 |
|----------|------|------|
| CU1 | - | 0,13 |
| CU2 | 3,31 | - |

Les valeurs de l'indice de Shannon obtenues sont relativement élevées ($I_{CU1} = 1,32$ et $I_{CU2} = 1,56$). Le nombre d'allèles privés le plus élevé ($PAS = 45$) a été noté chez le premier cluster alors que le deuxième a présenté le nombre d'allèles efficaces le plus élevé ($N_e = 5,12$) (Tableau 18). En outre, la diversité des gènes par locus la plus élevée a été enregistrée chez le CU2 ($H = 0,68$) (Tableau 18).

Tableau 18 Fréquences des chémotypes, des mating types et les indices de la diversité génétique des clusters CU1 et CU2 de la population algérienne de *F. culmorum* déterminés par le logiciel STRUCTURE.

| Clusters | N_e | I | H | PAS | 3ADON | NIV | MATI-1 | MATI-2 |
|------------|-------|------|------|-------|-------|-----|--------|--------|
| CU1 | 4,27 | 1,32 | 0,53 | 45 | 77 | 3 | 26 | 8 |
| CU2 | 5,12 | 1,56 | 0,68 | 24 | 12 | 11 | 54 | 15 |

IV.4. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE DES ISOLATS DE *F. CULMORUM*

L'effet d'une gamme de températures (5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35°C) sur la croissance mycélienne des 139 isolats algériens de *F. culmorum* a été étudié sur milieu PDA et à l'obscurité. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une variabilité dans la croissance mycélienne entre les isolats aux différentes températures testées. Cette croissance mycélienne augmente entre 5 et 20°C chez tous les isolats de *F. culmorum*. Par contre, elle diminue entre 25 et 35°C et elle est complètement inhibée à 5 et à 35°C (Fig. 34) (Annexe 10).

L'optimum de la croissance mycélienne se situe à 20°C pour 16 isolats de *F. culmorum* et à 25°C pour le reste des isolats étudiés ($n = 123$) (Annexe 10). Trente-deux isolats ont présenté le diamètre moyen le plus élevé à 25°C, alors que celui-ci a été enregistré chez les isolats IL 196, IL 179 et IL 279 aux températures respectives 10, 15 et 30°C. Les isolats IL 190, IL 226, IL 267, IL 291, IL 344 et IL 403 ont montré le diamètre moyen le plus élevé à 20°C (Fig. 34) (Annexe 10).

L'analyse de la variance du diamètre moyen des colonies des isolats de *F. culmorum* a montré l'existence d'une différence très hautement significative entre les isolats aux différentes températures d'incubation testées ($P < 0,001$) (Annexe 10).

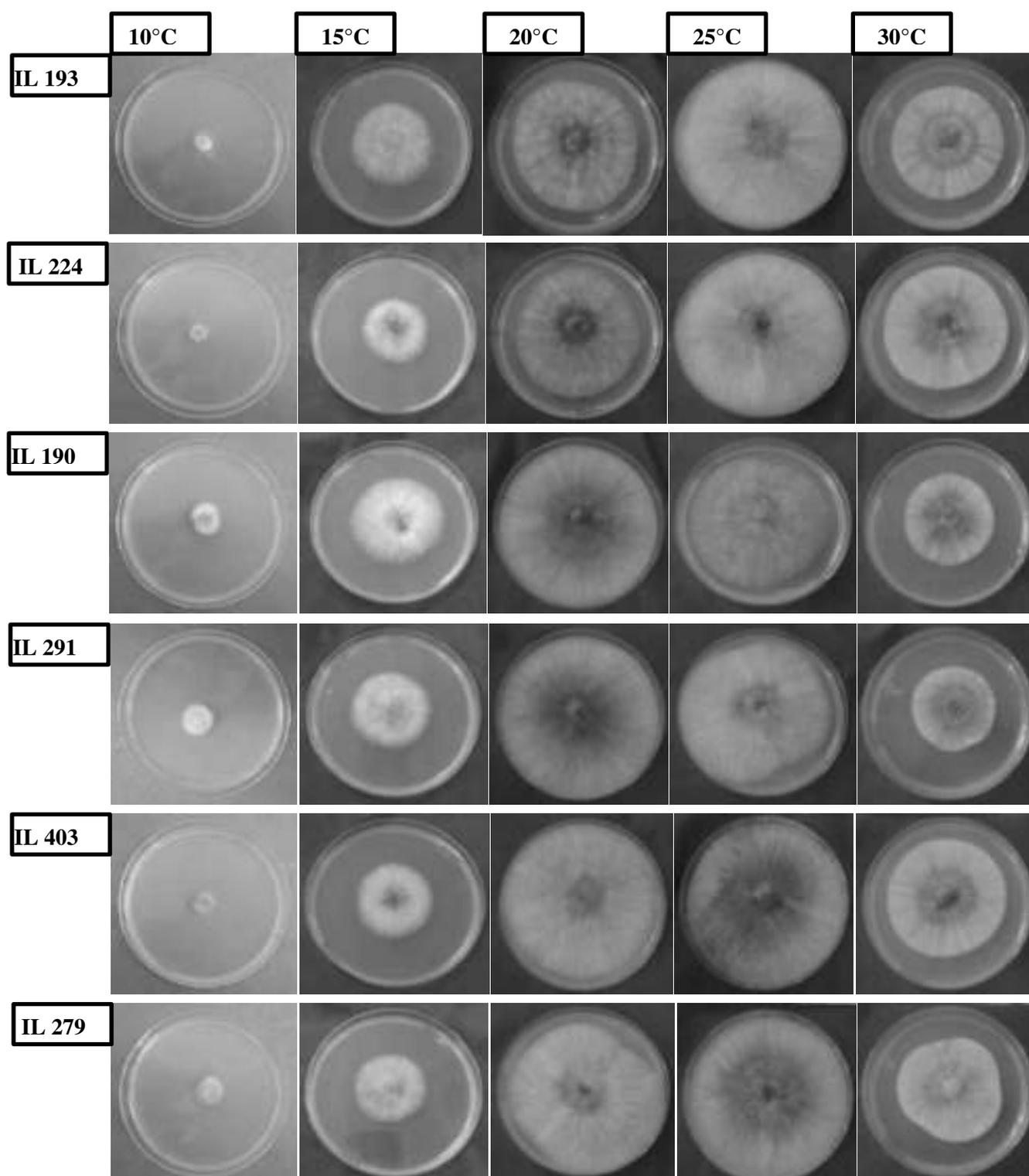


Figure 34 Croissance mycélienne de quelques isolats de *F. culmorum* (IL 193, IL 224, IL 190, IL 291, IL 403, IL 279) après 4 jours d'incubation à 10, 15, 20, 25 et 30°C.

IV.5. AGRESSIVITÉ DES ISOLATS DE *F. CULMORUM* SUR COLLET ET ÉPI DU BLÉ

IV.5.1. Agressivité des isolats de *F. culmorum* sur collet

Afin d'évaluer l'agressivité des isolats de *F. culmorum* sur collet des plantules des deux variétés de blé Vitron et HD 1220, l'essai réalisé *in vivo* a été suivi quotidiennement pendant 35 jours après le semis. Les graines de blé semées dans le sol inoculé par *F. culmorum* ont donné naissance à des plantules montrant les symptômes typiques de la pourriture du collet qui se sont manifestés par des brunissements sur les racines et les collets (Fig. 35A-D). Tous les isolats testés ont induit des nécroses sur les parties basales des plantules. Les symptômes ont apparu 15 jours après le semis chez les plantules de la variété Vitron inoculées par les isolats IL 264, IL 217, IL 76, IL 127 et IL 173 et chez celles de la variété HD 1220 inoculées par l'isolat IL 76 17 jours après l'inoculation (Fig. 35A). La taille des tissus nécrosés augmente avec le temps (Fig. 35A-C). Les plantules témoins des deux variétés n'ont montré aucun symptôme durant toute la période de l'essai (Fig. 35E-F).

Les plantules ont été arrachées 35 jours après le semis. Les symptômes ont été notés selon une échelle de 4 degrés (Fig. 35D). Les indices de la maladie ont été calculés par la suite pour chaque isolat (Annexe 11). Les résultats obtenus indiquent que les isolats les plus agressifs sur la variété Vitron sont IL 264 et IL 76 avec des indices de la maladie respectifs de 2,44 et de 2,41. Sur la variété HD 1220, l'isolat IL 76 s'est avéré le plus agressif avec un indice de 2,20. Les isolats IL 264 et IL 76 ont été obtenus à partir des collets du blé. Les indices de la maladie les plus faibles ont été notés chez les plantules inoculées par l'isolat IL 394, obtenu à partir du collet, avec des indices de 0,74 et de 0,5 respectivement pour les variétés Vitron et HD 1220. Les isolats les plus agressifs ont entraîné la mort de quelques plantules à la fin de l'essai. Les isolats obtenus à partir des épis ont également causé des symptômes au niveau des racines et du collet avec des indices de la maladie qui varient de 0,84 à 2,38 et de 0,56 à 2,14 respectivement pour les variétés Vitron et HD 1220.

Les données obtenues ont révélé l'existence d'une différence d'agressivité très hautement significative entre les isolats de *F. culmorum* ($P < 0,001$). Par ailleurs, une différence très hautement significative des indices de la maladie a été également observée entre les deux variétés HD 1220 et Vitron ($P < 0,001$). Cette dernière semble être plus sensible aux attaques des isolats de *F. culmorum* par rapport à la variété HD 1220 (Annexe 11).

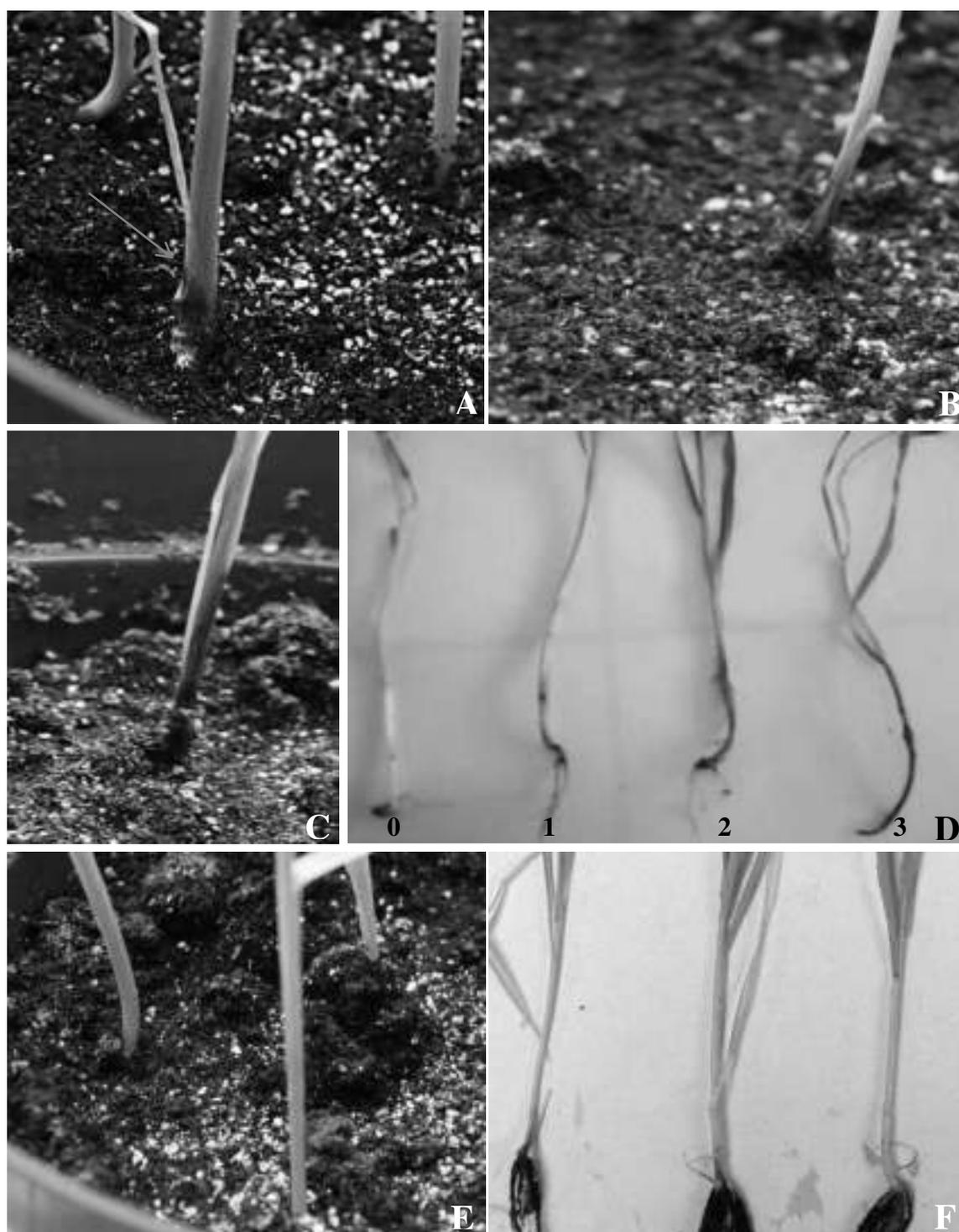


Figure 35 Comparaison entre les collets des plantules inoculées par les isolats de *F. culmorum* et témoins. A-C. Évolution des symptômes chez les plantules inoculées. A. Après 15 jours de l'inoculation. B. Après 20 jours de l'inoculation. C. À la fin de l'essai (35 jours). D. Les différents degrés d'agressivité observés. E. Collets sains des plantules témoins au cours de l'essai. F. Collets sains des plantules témoins à la fin de l'essai (35 jours).

IV.5.2. Agressivité des isolats de *F. culmorum* sur épi

Au cours de cet essai, l'agressivité de 75 isolats de *F. culmorum* a été étudiée sur épi des deux variétés de blé Vitron et HD 1220.

Les premiers symptômes ont été observés dix jours après inoculation chez les épis de la variété Vitron inoculés par une suspension de spores des isolats IL 1, IL 340 et IL 45. Par contre, chez la variété HD 1220 les épis inoculés par les isolats IL 193 et IL 128 n'ont montré les premiers symptômes que 12 jours après l'inoculation. Ces symptômes se sont manifestés par des nécroses ovales et humides sur les glumes qui ont évolué par la suite en un dessèchement des épillets accompagné le plus souvent par des amas de spores roses à oranges (Figs. 36A et 37A-B, H-J). Le nombre d'épillets desséchés varie en fonction du degré d'agressivité de l'isolat qui peut engendrer un dessèchement partiel ou total de l'épi (Figs. 36B-C et 37C-G). Les épis témoins non inoculés n'ont montré aucun symptôme durant toute la période de l'essai. À la fin de l'essai, toutes les microparcelles inoculées se sont entièrement desséchées alors que celles témoins n'ont montré aucun dessèchement (Figs. 38 et 40).

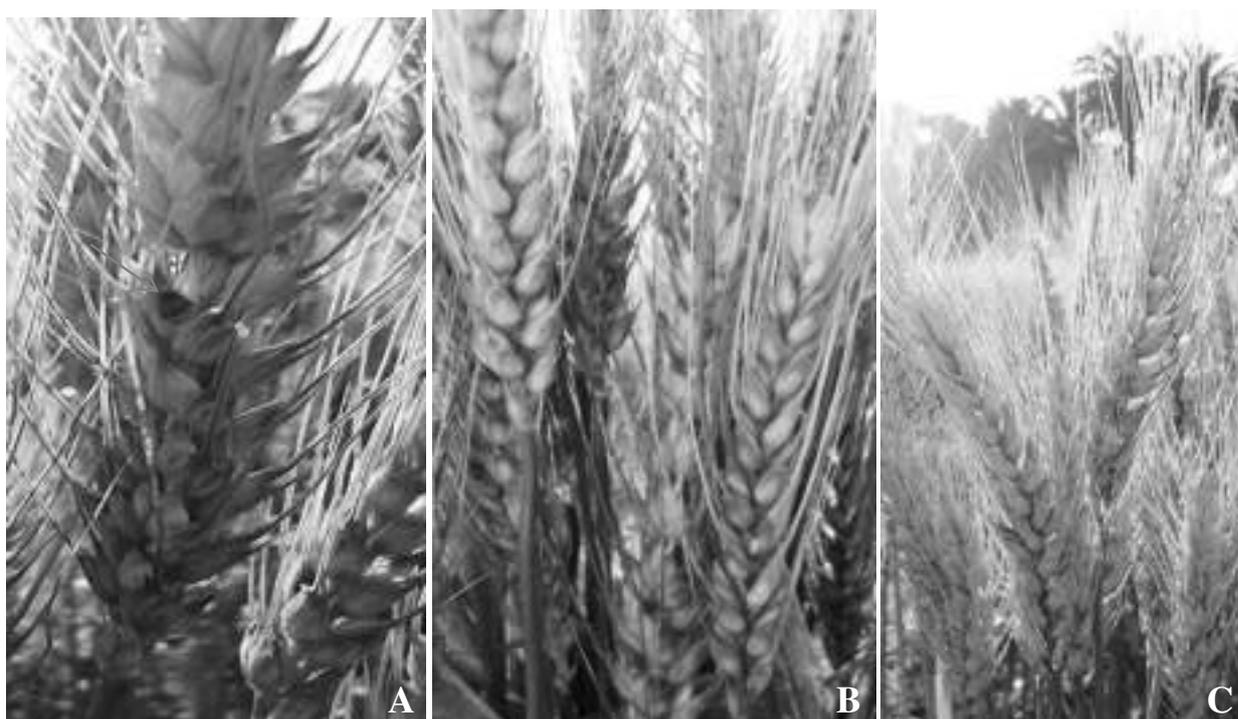


Figure 36 Symptômes de la fusariose de l'épi observés sur la variété HD 1220 suite à une inoculation par les isolats de l'espèce *F. culmorum*. A. Début d'apparition des symptômes sur les épis (Après 12 jours d'inoculation). B. Dessèchement partiel des épis. C. Dessèchement total des épis.

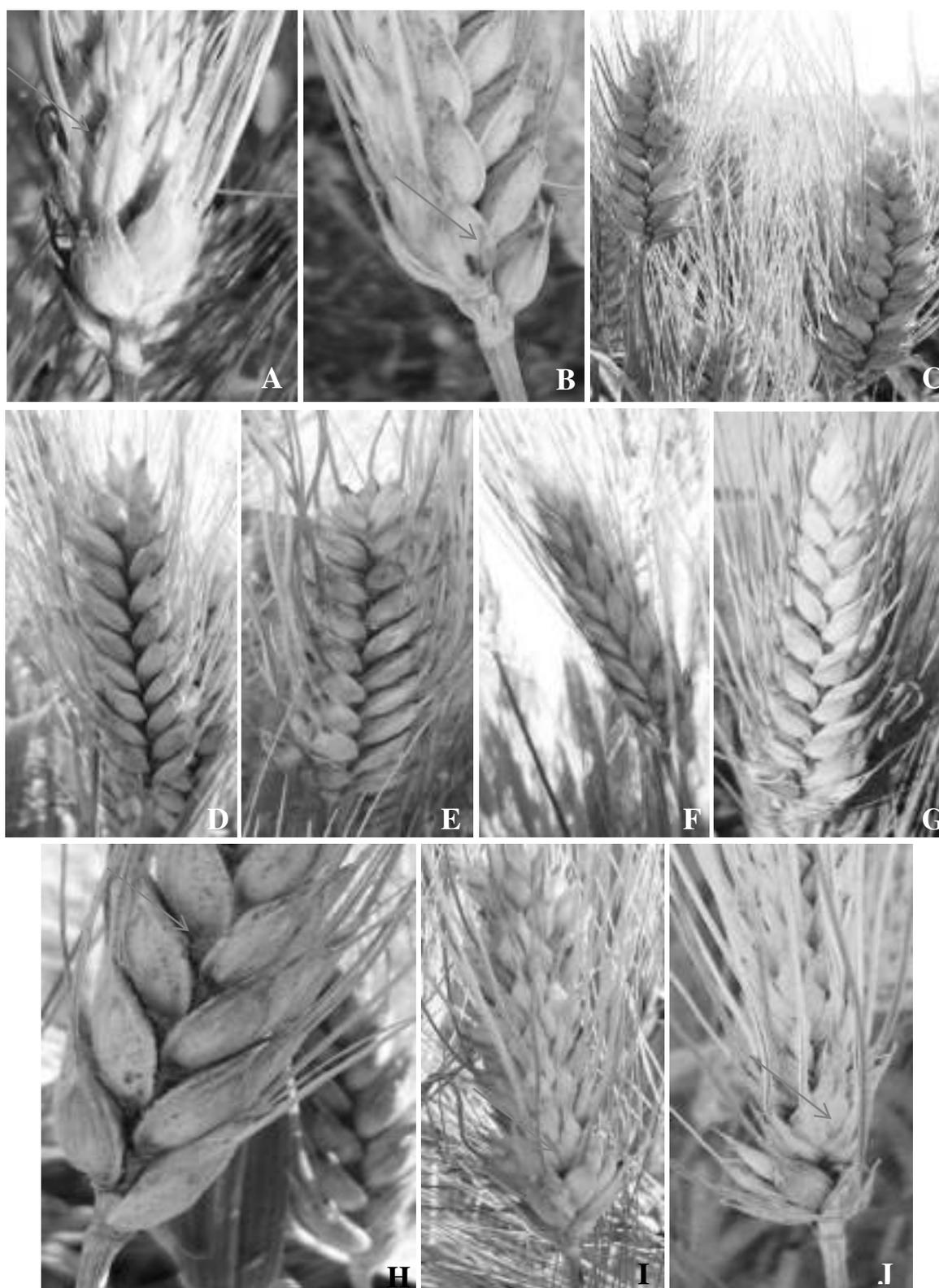


Figure 37 Symptômes de la fusariose de l'épi observés sur la variété Vitron suite à une inoculation par les isolats de l'espèce *F. culmorum*. A-B. Début d'apparition des symptômes sur les épis (Après 10 jours d'inoculation). C-E. Dessèchement partiel des épis. F-G. Dessèchement total des épis. H-J. Amas de sporodochies oranges sur les épillets.

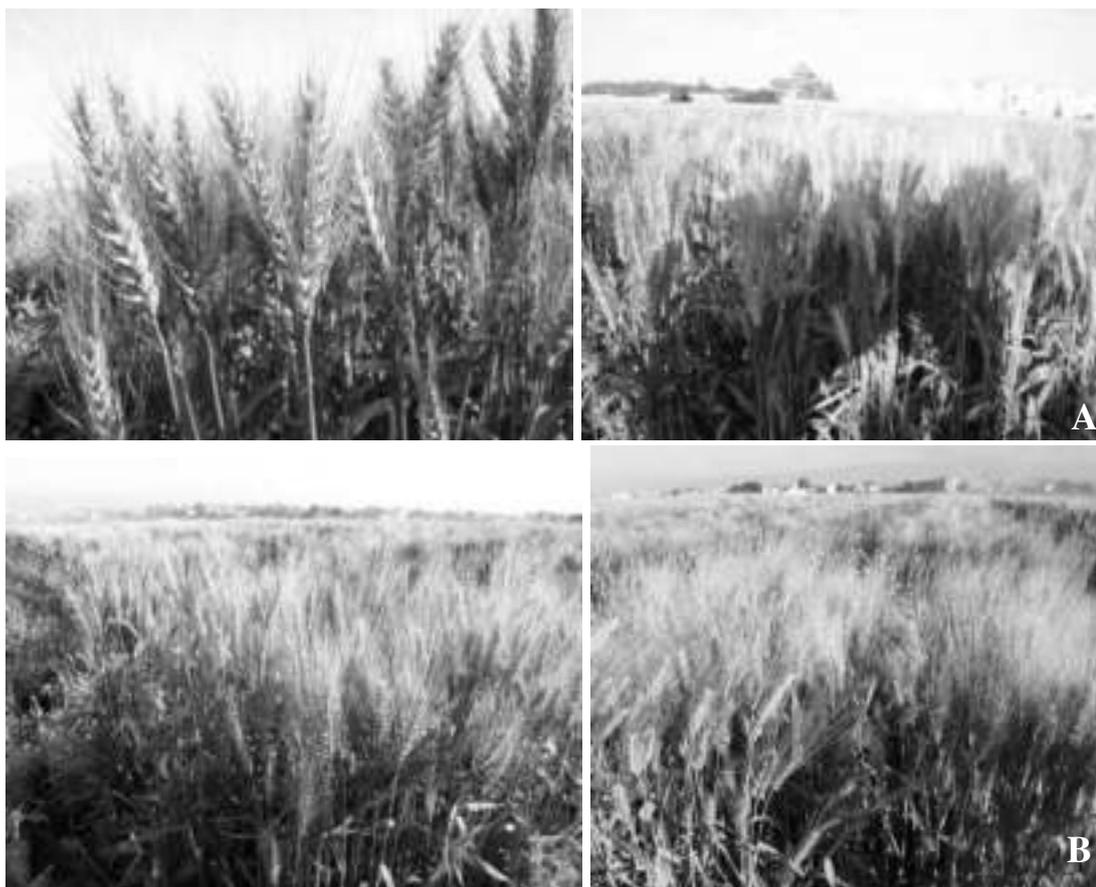


Figure 38 Comparaison entre les microparcelles témoins et inoculées. A. Variété HD 1220. B. Variété Vitron.

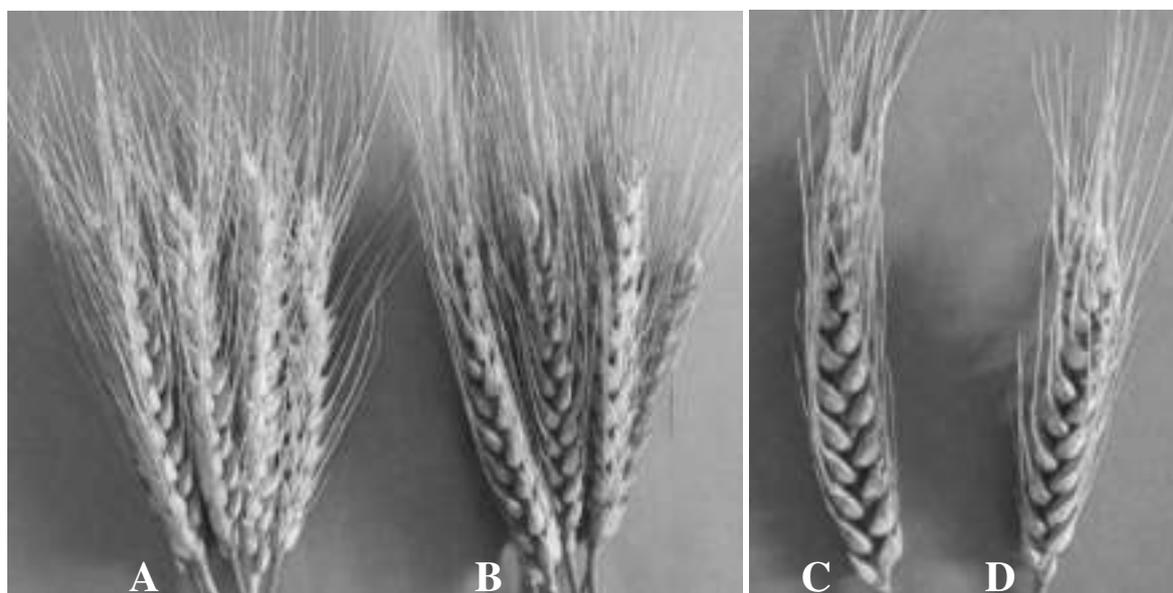


Figure 39 Comparaison entre des épis témoins et inoculés de la variété HD 1220. A et D. Épis inoculés. B et C. Épis témoins.



Figure 40 Comparaison entre des épis témoins et inoculés de la variété Vitron. A et D. Épis inoculés. B et C. Épis témoins.

L'indice de la maladie a été évalué selon une échelle de notation à 9 degrés correspondant chacun à un pourcentage d'attaque des épis (Figs. 41 et 42). Les indices d'attaque obtenus pour tous les isolats sont indiqués dans l'annexe 12. Les résultats obtenus montrent que les isolats les plus agressifs sur les variétés Vitron et HD 1220 sont IL 1 avec des indices d'attaque respectifs de 89 et de 72%. Cet isolat a été obtenu à partir du collet de blé. En revanche, les isolats les moins agressifs sur les variétés Vitron et HD 1220 sont IL 21 et IL 18 avec des indices d'attaque respectifs de 49 et de 24% (Fig. 43A-D). Ces données révèlent que les isolats obtenus à partir du collet peuvent également causer la fusariose de l'épi à des degrés d'agressivité élevés. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une différence d'agressivité très hautement significative entre les isolats de *F. culmorum*. En outre, une différence très hautement significative des indices de la maladie a été également enregistrée entre les deux variétés de blé testées ($P < 0,001$). Il est à noter que la variété HD 1220 s'est montrée plus résistante que Vitron. Les pourcentages de réduction du PMG les plus élevés et les plus faibles sont respectivement notés chez les isolats IL 1 (73 %) et IL 18 (33%) pour la variété Vitron et chez les isolats IL 304 (68 %) et IL 18 (29%) pour la variété HD 1220 (Annexe 12). Les résultats obtenus pour les pourcentages de réduction du PMG ont révélé une différence très hautement significative entre les isolats et entre les deux variétés ($P < 0,001$). Une corrélation très hautement significative a été enregistrée entre les indices de la maladie sur épis et les pourcentages de réduction du poids de mille grains engendrés par les isolats de *F. culmorum* ($r = 0,72$ pour la variété Vitron et $r = 0,79$ pour la variété HD 1220, $P < 0,001$) (Annexe 12). Ainsi, le PMG diminue avec l'augmentation de l'agressivité de l'isolat.

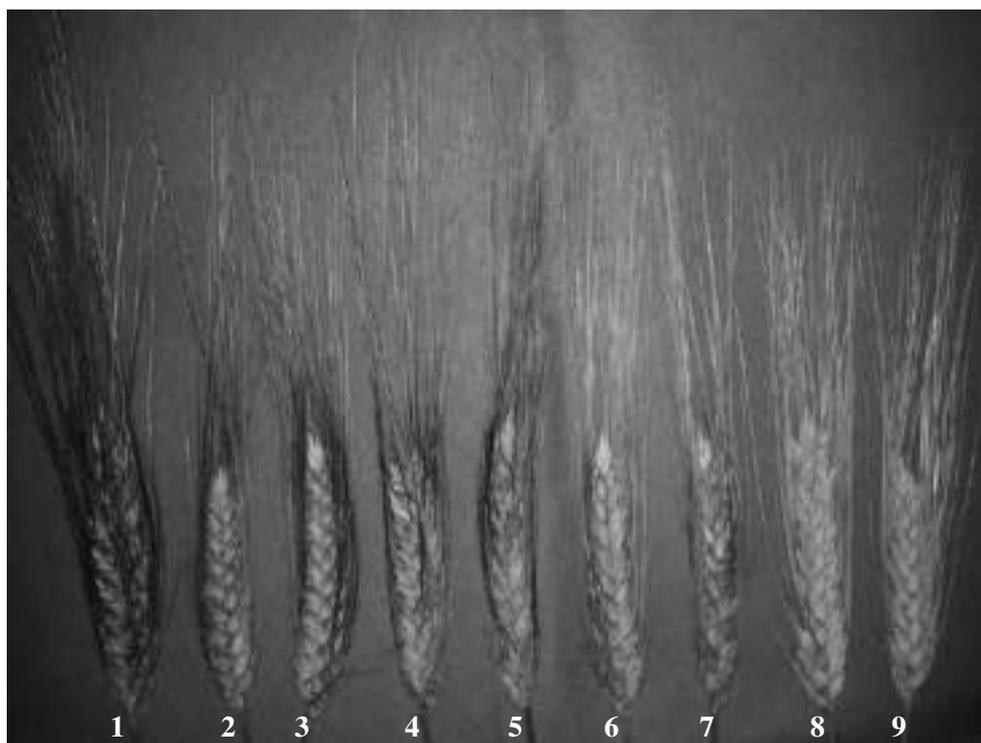


Figure 41 Échelle des degrés d'attaques observés sur les épis de la variété Vitron.



Figure 42 Échelle des degrés d'attaques observés sur les épis de la variété HD 1220.

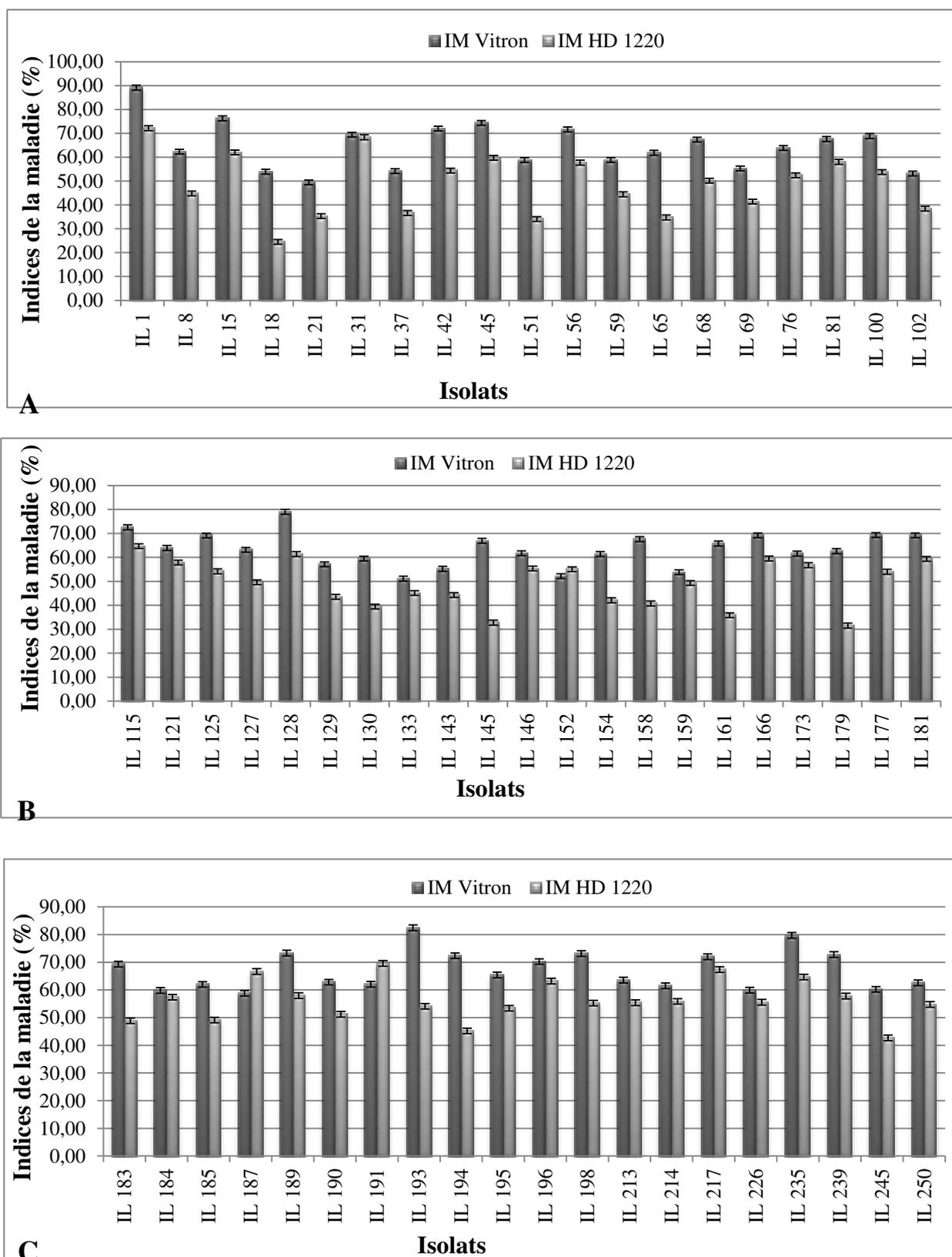


Figure 43 Sévérité de la maladie évaluée 21 jours après l'inoculation des épis par les isolats de *F. cul-*
morum. A. Les isolats IL 1 à IL 102. B. Les isolats IL 115 à IL 181. C. Les isolats IL 183 à IL 250.

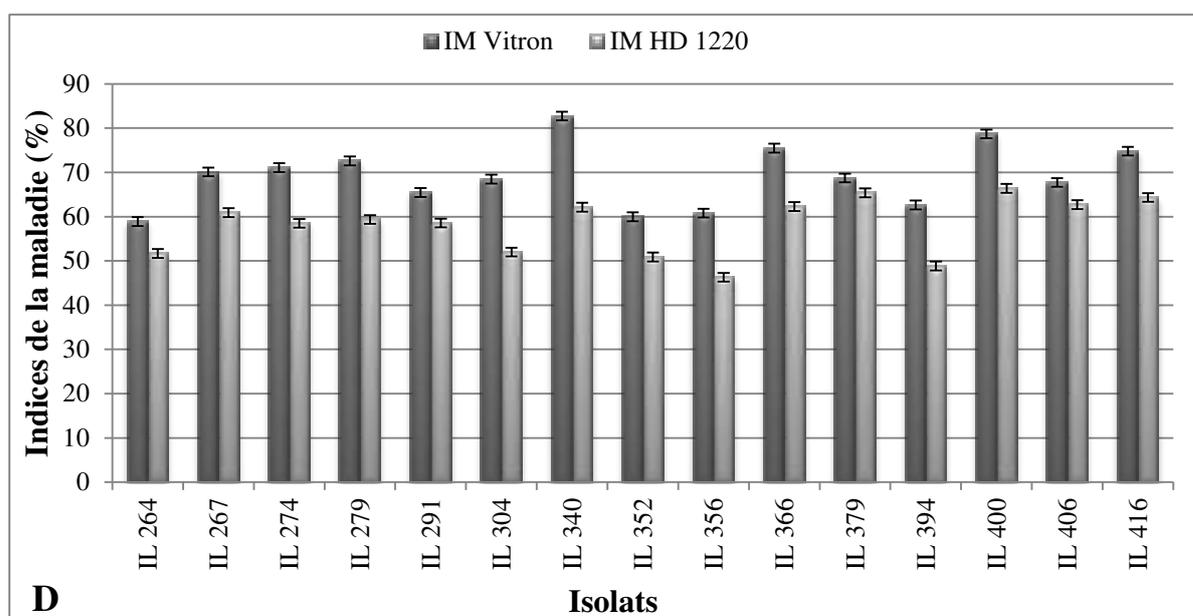


Figure 43 suite Sévérité de la maladie évaluée 21 jours après l'inoculation des épis par les isolats de *F. culmorum*. D. Les isolats IL 264 à IL 416.

Discussion

V. DISCUSSION

Les prospections réalisées dans les différentes régions céréalières durant les deux campagnes céréalières 2013-2014 et 2014-2015 ont confirmé la présence de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé en Algérie. La pourriture du collet a été détectée dans presque toutes les wilayas prospectées appartenant aux étages bioclimatiques humide, subhumide et semi-aride. En revanche, la fusariose de l'épi a été observée principalement dans les étages bioclimatiques subhumide et humide de l'est et du centre du pays où les conditions climatiques y sont favorables. Cette maladie a été signalée dans 3 wilayas uniquement à l'ouest d'Algérie qui se caractérise par une sécheresse sévère et une persistance du déficit pluviométrique. Les facteurs climatiques semblent jouer un rôle déterminant dans le développement de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé. La pourriture du collet qui est favorisée par des conditions chaudes et sèches est largement distribuée dans la majorité des régions céréalières alors que la fusariose de l'épi qui exige un climat doux et humide est principalement confinée dans le nord-est et le centre du pays. La différence dans la prévalence de ces deux maladies enregistrée entre les champs et entre les wilayas prospectées peut être expliquée par les conditions climatiques qui diffèrent d'une région à une autre et également par la différence de certaines pratiques culturales (irrigation par pivot, traitements phytosanitaires, etc.). Les études réalisées de par le monde sur la distribution de ces deux maladies par rapport aux conditions climatiques concordent avec nos données (Moya-Alenzo, 2013 ; Vaughan *et al.*, 2016). En effet, la pourriture du collet a été signalée dans les régions à climat sec et chaud comme celles des États-Unis (Smiley *et al.*, 2005), de l'Australie (Akinsanmi *et al.*, 2006), de la Turquie (Tunali *et al.*, 2006), de la Syrie (El-Khalifeh *et al.*, 2009), de l'Iran (Pouzeshimiab *et al.*, 2014), de la Tunisie (Rebib *et al.*, 2014), de la Sardaigne (Balmas *et al.*, 2015) et de l'Irak (Matny *et al.*, 2017). Par contre, la fusariose de l'épi est largement répandue sous les climats humides et doux du Canada, des États-Unis, de l'Europe, de l'Asie et de l'Australie (Goswami et Kistler, 2004 ; McMullen *et al.*, 2012). La fusariose de l'épi a été également signalée récemment dans certains pays d'Afrique du Nord comme la Tunisie (Kammoun-Gargouri, 2010) et l'Algérie (Touati-Hattab *et al.*, 2016), d'Asie comme la Syrie (Alkadri *et al.*, 2013), l'Iran (Abedi-Tizaki *et al.*, 2017) et Taiwan (Wang et Cheng, 2017) et d'Amérique latine (Alconada Magliano et Chulze, 2013).

L'identification morphologique des isolats basée sur les critères macroscopiques et microscopiques établis par Nelson *et al.* (1983), Samuel et Hallet (1983), Leslie et Summerell (2006) et Hoshino *et al.* (2009) nous a permis de distinguer deux genres (*Fusarium* et *Microdochium*) et d'identifier certaines espèces appartenant au genre *Fusarium*. Cependant, cette identification mor-

phologique ne nous a pas permis, le plus souvent, de déterminer avec certitude les espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Microdochium*. Afin de confirmer l'identité des isolats obtenus, cette identification morphologique a été complétée par un séquençage du gène *TEF1- α* dans le cas des isolats de *Fusarium* et par une PCR spécifique en ce qui concerne les espèces de *Microdochium*.

L'identification moléculaire des isolats obtenus à partir des collets et des épis du blé a abouti à la détermination des espèces suivantes: *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. brachygibbosum*, *F. cerealis*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. tricinctum*, le complexe d'espèces *Fusarium incarnatum-equiseti*, *M. nivale* et *M. majus*. À l'exception des deux espèces *F. oxysporum* et *F. equiseti* qui sont considérées comme des agents saprophytes sur les tissus du blé nécrosés, toutes les autres espèces identifiées sont impliquées dans la pourriture du collet et la fusariose de l'épi du blé (Parry *et al.*, 1995 ; Leslie et Summerell, 2006 ; Van Coller *et al.*, 2012 ; Ren *et al.*, 2015 ; Gebremariam *et al.*, 2017).

Les identifications morphologiques et moléculaires ont révélé que l'espèce *F. culmorum* est la plus répandue en Algérie (46%). En effet, cette espèce a été trouvée dans 23 wilayas sur les 30 prospectées. Les travaux d'Abdallah (2013) et Ghalem-Djender *et al.* (2013) ont également montré la prédominance de cette espèce dans plusieurs wilayas. Cette dominance de *F. culmorum* par rapport aux autres espèces associées à la pourriture du collet et à la fusariose de l'épi du blé a été également constatée dans plusieurs pays comme l'Italie (Pancaldi *et al.*, 2010 ; Balmas *et al.*, 2015), la Tunisie (Kammoun-Gargouri, 2010 ; Rebib *et al.*, 2014), l'Iran (Pouzeshimiab *et al.*, 2014) et l'Irak (Matny *et al.*, 2017). En revanche, une diminution de la fréquence de *F. culmorum* au profit de *F. graminearum* a été signalée dans d'autres pays comme les Pays-Bas (Waalwijk *et al.*, 2003), la France (Ioos *et al.*, 2004) et le Royaume-Uni (Jennings *et al.*, 2004). Cette diminution de la fréquence de *F. culmorum* par rapport à *F. graminearum* dans ces pays pourrait s'expliquer par les conditions climatiques, les pratiques culturales à savoir l'introduction du maïs en Europe et les traitements fongicides.

Le séquençage d'une portion du gène *TEF1- α* a permis l'identification de l'espèce *F. pseudograminearum* isolée à partir du collet et de l'épi. Cette espèce est principalement responsable de la pourriture du collet du blé aux États-Unis (Smiley *et al.*, 2005), en Australie (Chakraborty *et al.*, 2006) et en Iran (Saremi *et al.*, 2007). Néanmoins, elle cause également la fusariose de l'épi en Australie (Akinsanmi *et al.*, 2004 ; Akinsanmi *et al.*, 2006), en Tunisie (Kammoun-Gargouri *et al.*, 2009) et en Syrie (Alkadri *et al.*, 2013). *F. graminearum* qui est morphologiquement semblable à *F. pseudograminearum* semble être absent dans les wilayas prospectées lors de cette étude. Cette absence est pro-

blement due aux conditions climatiques algériennes et aux pratiques culturelles adoptées qui ne favorisent pas le développement de *F. graminearum*.

L'identification moléculaire des isolats de *Microdochium* par l'utilisation d'amorces spécifiques a permis de distinguer deux espèces morphologiquement identiques *M. majus* et *M. nivale*. Ces espèces sont principalement répandues dans les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord (Parry *et al.*, 1995 ; Jewell et Hsiang, 2013). Cependant, plusieurs études ont rapporté leur présence dans d'autres pays caractérisés par différentes conditions climatiques (Tronsmoet *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2005 ; Kammoun-Gargouri *et al.*, 2009). En outre, l'espèce *M. nivale* a été déjà signalée sur épi en Algérie (Ghalem-Djender *et al.*, 2013).

Les chémotypes des isolats de *F. culmorum* provenant d'Algérie, d'Australie, d'Italie et des États-Unis ont été déterminés par ASO PCR en utilisant des amorces spécifiques des deux gènes *Tri3* et *Tri12*. Les résultats obtenus révèlent que plus de 80% des isolats de *F. culmorum* d'Algérie, d'Australie et des États-Unis sont du chémotype 3ADON, alors qu'environ deux tiers des souches italiennes possèdent le chémotype 3ADON. Le reste des isolats se sont avérés du chémotype NIV. Ces deux chémotypes ont été décrits chez *F. culmorum* à travers le monde avec des fréquences variables entre les pays et les années. C'est ainsi que chez l'espèce *F. culmorum*, le chémotype 3ADON a été rapporté comme dominant en France (Logrieco *et al.*, 2003), en Tunisie (Kammoun-Gargouri *et al.*, 2010), en Turquie (Yörük et Albayrak, 2012) et en Italie (Prodi *et al.*, 2011 ; Balmas *et al.*, 2015). Une étude menée récemment par Pasquali *et al.* (2016a) a révélé que le chémotype 3ADON est le plus fréquent en Europe durant la période 2000-2013. Par ailleurs, le 3ADON est le seul chémotype présent dans certains pays comme l'Allemagne (Muthomi *et al.*, 2000), le Royaume-Uni (Tóth *et al.*, 2004) et la Tunisie (Rebib *et al.*, 2014). Concernant le chémotype NIV, une augmentation de sa fréquence a été signalée au Royaume-Uni (Jennings *et al.*, 2004) et au Luxembourg (Pasquali *et al.*, 2010). Cette augmentation est principalement attribuée à la rotation du blé avec le maïs (Pasquali *et al.*, 2010). Les changements spectaculaires des fréquences des agents causaux de la fusariose de l'épi et des chémotypes enregistrés au cours de ces dernières années en Europe et en Amérique du Nord soulignent la nécessité d'une surveillance de ces agents en raison de leur potentiel toxigène (Ward *et al.*, 2008 ; Pasquali et Migheli, 2014 ; Kelly *et al.*, 2015 ; Pasquali *et al.*, 2016a). En Algérie, les isolats du chémotype 3ADON se sont montrés plus fréquents par rapport à ceux producteurs du nivalelol. La dominance du chémotype 3ADON doit être prise en compte lors des études épidémiologiques de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi. De ce fait, il devient de plus en plus néces-

saire d'établir en Algérie une réglementation législative compte tenu de la présence de ces deux toxines dans les céréales et leurs dérivés.

Les amplifications par PCR permettent de déterminer le chémotype d'un isolat donné alors que les analyses biochimiques quantifient les toxines produites. Pour cela, les données de la ASO PCR de 134 isolats algériens de *F. culmorum* ont été complétées par une analyse biochimique par GC-MS à partir de cultures de ces isolats sur un milieu à base d'agmatine (Gardiner *et al.*, 2009 ; Pasquali *et al.*, 2016b). Les résultats de la quantification par GC-MS des différentes toxines produites *in vitro* par les isolats de *F. culmorum* confirment les chémotypes identifiés lors de la ASO PCR. Les quantités de toxines produites sur le milieu de culture à base d'agmatine varient selon les isolats. C'est ainsi qu'une différence entre les souches de *F. culmorum* a été observée par rapport aux concentrations de la trichothécène 3ADON et de la culmorine synthétisées. En effet, 80 isolats de *F. culmorum* ont produit le 3ADON à des concentrations variables et 18 seulement ont synthétisé le NIV. Une coproduction de la culmorine avec le NIV ou le 3ADON a été enregistrée chez ces 98 isolats. En plus de ces derniers, 15 autres isolats ont produit uniquement la culmorine. En revanche, aucune coproduction du 3ADON et du NIV n'a été constatée.

La variabilité des quantités du 3ADON produites par les isolats de *F. culmorum* a été également constatée par plusieurs auteurs (Bakan *et al.*, 2002 ; Kammoun-Gargouri *et al.*, 2010 ; Pasquali *et al.*, 2010 ; Alkadri *et al.*, 2013). Bien que plusieurs études ont démontré la phytotoxicité de la culmorine sur les tissus du blé, il existe très peu de données sur sa toxicité sur les cellules animales et sur son rôle exact dans l'infection du collet et de l'épi (McCormick *et al.*, 2010). Ainsi, Ghebremeskel et Langseth (2001) ont découvert que des échantillons de blé norvégiens naturellement contaminés, contenaient des concentrations élevées du 3ADON et de la culmorine.

Dans notre étude, aucune trace de toxines n'a été détectée chez 21 isolats de *F. culmorum* cultivés sur milieu de culture à base d'agmatine. Afin de déceler une éventuelle capacité à produire des toxines, ces 21 isolats ont été cultivés sur un substrat à base de graines de riz. Quatre isolats sur les 21 cultivés sur ce substrat ont synthétisé la culmorine alors que deux uniquement ont produit le 3ADON. Plusieurs auteurs ont également constaté une absence de la production *in vitro* du 3ADON chez certains isolats de *F. culmorum* du chémotype 3ADON (Quarta *et al.*, 2005 ; Kammoun-Gargouri *et al.*, 2010). L'absence de la production du NIV a été également observée chez certains isolats du chémotype NIV (Pasquali *et al.*, 2010). En fait, la production des trichothécènes du type B (principalement le 3ADON et le NIV) par *F. graminearum* est influencée par de nombreux facteurs comme la lumière, le pH, les sources carbonées et azotées. Ces facteurs interviennent dans la régula-

tion des différentes étapes de la biosynthèse des trichothécènes (Merhej, 2010 ; Merhej *et al.*, 2011b). Par ailleurs, il a été démontré que le potentiel toxigène de *F. culmorum* et d'autres espèces de *Fusarium* est influencé par la température (Ramirez *et al.*, 2006 ; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008), l'humidité (Beyer *et al.*, 2005), le pH (Bily, 2003 ; Merhej *et al.*, 2011b) et la source de carbone et d'azote (O'Neill *et al.*, 1993 ; Jiao *et al.*, 2008). Cette variabilité du potentiel toxigène enregistrée chez les isolats de l'espèce *F. culmorum* sur le milieu de culture à base d'agmatine et sur le substrat à base de graines de riz peut être également expliquée par leur polymorphisme génétique. En effet, sur la base de la variabilité génétique des isolats de *F. culmorum*, Bakan *et al.* (2002) ont distingué deux groupes de souches du chémotype déoxynivalénol en fonction des quantités de toxine produites.

La détermination des types sexuels (*MAT1-1* et *MAT1-2*) des isolats de *F. culmorum* originaires d'Algérie, d'Australie, d'Italie et des États-Unis a été réalisée par une PCR spécifique. La coexistence de ces deux types sexuels chez *F. culmorum* a été signalée dans plusieurs pays (Miedaner *et al.*, 2013 ; Rebib *et al.*, 2014). Nos résultats montrent l'existence des deux "mating type" chez les isolats de *F. culmorum* des quatre pays (Algérie, Australie, Italie et États-Unis). Dans toute la population de *F. culmorum* étudiée, 64% des isolats se sont avérés du type sexuel *MAT1-2*. Dans les populations italienne, australienne et américaine les types sexuels *MAT1-1* et *MAT1-2* sont présents en nombre presque égal. En Algérie, les deux types sexuels ont été décelés au sein d'un même champ. Ceci a été également rapporté par Rebib *et al.* (2014) dans deux champs en Tunisie. Bien que le téléomorphe de *F. culmorum* reste encore inconnu, ces résultats suggèrent que cette espèce peut avoir un cycle sexuel qui reste à découvrir (Obanor *et al.*, 2010).

La diversité génétique d'une collection d'isolats de *F. culmorum* originaire d'Algérie, d'Italie, d'Australie et des États-Unis a été étudiée par l'emploi de 10 marqueurs SSR (Giraud *et al.*, 2002 ; Suga *et al.*, 2004 ; Vogelgsang *et al.*, 2009). Cette étude de la diversité génétique a été facilitée par la publication du génome complet de la souche UK99 de *F. culmorum* (Urban *et al.*, 2016). En outre, les deux marqueurs F1 et F7 ont été utilisés ensemble pour la caractérisation de plusieurs populations de *F. culmorum* (Giraud *et al.*, 2002 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014). En cartographiant les marqueurs SSR sur le génome de la souche UK99, on a remarqué que les amorces F1f et F7f sont localisées sur le même locus du chromosome trois. Les résultats de l'amplification des différents marqueurs SSR ont montré que les deux marqueurs F1 et F7 ont amplifié le même nombre d'allèles. C'est pour cette raison que nous n'avons tenu compte que d'un seul marqueur pour étudier la diversité et la structure génétique de notre population de *F. culmorum*.

Les marqueurs SSR ont été largement employés pour étudier la diversité et la structure génétique des populations en raison de leur codominance et de leur polymorphisme élevé, comme en témoignent les 135 allèles détectés dans notre étude. Ce nombre d'allèles s'est avéré trois fois supérieur à ceux précédemment rapportés dans les autres études des populations de *F. culmorum* (Giraud *et al.*, 2002 ; Miedaner *et al.*, 2013 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014 ; Rebib *et al.*, 2014). Ceci peut être expliqué en partie par l'utilisation d'un nombre plus élevé de marqueurs SSR (9) et d'isolats provenant de différents continents et en grande partie par le pouvoir de résolution de l'analyseur génétique utilisé. Ce dernier nous a permis de distinguer des allèles qui diffèrent seulement par deux pb. Les études précédentes des populations de *F. culmorum* provenant de différents pays qui ont employé 6 à 8 marqueurs SSR uniquement ont détecté un faible nombre d'allèles (33 à 44) (Miedaner *et al.*, 2013 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014 ; Rebib *et al.*, 2014). La plupart des auteurs ont utilisé des gels d'agarose ou de polyacrylamide avec un faible pouvoir de résolution.

Dans notre étude, 40 souches sur les 231 caractérisées ont été retirées car deux allèles nuls ou plus ont été obtenus chez chaque isolats. Cela peut être dû soit à une mutation dans la zone adjacente à l'amorce ce qui entraîne un défaut de liaison de l'amorce à l'ADN. Actuellement, la disponibilité du génome de *F. culmorum*, en particulier celui de la souche UK99, permettra certainement le développement de nouveaux marqueurs SSR plus polymorphes et plus robustes (Urban *et al.*, 2016).

Les données SSR collectées nous ont permis de détecter 9 clones au sein des populations étudiées. Avant l'élimination des 9 clones, 90% des haplotypes détectés au sein de la population globale de *F. culmorum* se sont montrés uniques. Ce pourcentage est plus au moins proche de celui estimé en Tunisie (78%) et en Iran (95,5%) (Rebib *et al.*, 2014 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014).

L'analyse hiérarchique de la variance moléculaire des quatre populations provenant d'Algérie, d'Italie, d'Australie et des États-Unis a révélé que la variation génétique la plus importante a été observée à l'intérieur de ces populations (89%). Des données obtenues aux différents loci SSR, ont également montré que la diversité génétique à l'intérieur des populations de *F. culmorum* est de l'ordre de 81% dans une population eurasiennne (Miedaner *et al.*, 2013).

Les faibles valeurs de φ_{PT} obtenues (0,06-0,13) indiquent une différenciation génétique modérée des populations des quatre pays. La différenciation la plus faible a été observée entre les isolats des populations italienne et australienne ($\varphi_{PT} = 0,06$). Cette différenciation modérée s'est traduit par un nombre efficace de migrants très élevé ($N_m = 7,85$). Les estimations du N_m ont donné des valeurs très élevées variant de 3,34 à 7,85 pour les populations des quatre pays. Ces valeurs indiquent un flux de

gènes significatif continu entre les populations de ces pays qui sont séparés par de grandes distances. Ces flux de gènes peuvent être partiellement expliqués par la dispersion de l'inoculum de *F. culmorum* (principalement les macroconidies et les chlamydozoospores) à grande distance par le commerce mondial des céréales et d'autres activités anthropogéniques (Cook, 1980 ; Obonar *et al.*, 2010). Nos estimations de φ_{PT} et du N_m sont proches de celles rapportées par Miedaner *et al.* (2013) qui ont indiqué une différenciation modérée ($\varphi_{PT} = 0,08$ à $0,38$) et un flux de gènes important ($N_m = 0,80$ à $4,84$) entre les populations de *F. culmorum* originaires d'Allemagne, de Russie et de Syrie.

Les estimations de l'indice de Shannon (I) et des nombres d'allèles efficaces (N_e) et privés (PAS) révèlent que la population algérienne possède les valeurs les plus élevées ($I = 1,57$, $N_e = 5,35$, $PAS = 35$). Ces valeurs indiquent que la diversité génétique de la population algérienne est plus importante par rapport à celle des trois autres pays. Étant donné que ces trois paramètres sont influencés par le nombre d'isolats, la diversité élevée de la population algérienne peut être due au nombre d'isolats utilisés.

Le nombre de populations structurées dans un échantillon n'est pas souvent connu *à priori*. La définition des populations en se basant sur des critères morphologiques, biochimiques ou géographiques ne correspond pas toujours à une structuration génétique. Deux groupes géographiquement proches peuvent être génétiquement distants, et inversement. Des progrès méthodologiques récents permettent de définir la structure des populations à partir de données génotypiques multilocus (Pritchard *et al.*, 2000). L'analyse de la structure de la population globale de *F. culmorum* originaire d'Algérie, d'Italie, d'Australie et des États-Unis a clairement mis en évidence l'existence de deux clusters désignés CU1 et CU2 sur l'ensemble des isolats étudiés. Ce niveau de subdivision des populations de *F. culmorum* a été déjà rapporté par Miedaner *et al.* (2013) qui ont également identifié deux clusters au sein d'une collection d'isolats de *F. culmorum* originaires d'Allemagne, de Russie et de Syrie.

Les deux clusters distingués au sein de la population globale de *F. culmorum* sont cosmopolites et sympatriques. Le CU1 est présent dans les quatre pays, par contre le CU2 semble être absent aux États-Unis. Le CU1 regroupe des isolats des quatre pays alors que le CU2 renferme la majorité des isolats algériens plus 5 italiens et un australien. La majorité des isolats de ces pays sont fortement assignés à l'un des deux clusters CU1 ou CU2 ($q \geq 0,80$). Quelques isolats ayant une probabilité d'assignation ($q < 0,80$) ont été également identifiés. Ces isolats sont considérés en "admixture". Ils semblent provenir d'une recombinaison génétique entre les deux clusters. En outre, cette division des isolats de *F. culmorum* en deux clusters est indépendante de leurs chénotypes, de leurs types sexuels et de leurs origines géographiques.

La diversité génétique à l'intérieure des clusters CU1 et CU2 représente environ 89% de la diversité globale. L'estimation du ϕ_{PT} suggère une différenciation modérée des deux clusters ($\phi_{PT} = 0,11$). La valeur du nombre efficace de migrants obtenue ($N_m = 3,98$) confirme ce résultat et indique un flux de gènes ou d'allèles élevé entre les isolats des deux clusters. Ce flux de gènes continu peut réduire ces deux clusters au fil du temps à une seule population.

L'indice de Shannon a été utilisé pour évaluer la variabilité génétique globale des deux clusters. Les résultats obtenus ($I = 1,77$ pour CU1 et $I = 1,33$ pour CU2) révèlent que le cluster CU1 a une diversité plus importante que le CU2. Ceci peut être expliqué par le fait que le CU1 est composé d'isolats provenant des quatre pays. Les valeurs de cet indice sont très élevées pour un champignon qui se reproduit exclusivement par voie asexuée. En plus, elles se sont révélées supérieures à celles de Miedaner *et al.* (2013) qui ont obtenu un $I = 0,85$.

Le déséquilibre de liaison a été estimé par le calcul de l'indice d'association ($\bar{r}d$) sur les paires de loci SSR. Les valeurs obtenues du $\bar{r}d$ (0,0294 pour le CU1 et 0,0325 pour le CU2) révèlent un déséquilibre de liaison significatif au sein des deux clusters. Ce déséquilibre observé au sein des deux clusters est dû principalement aux marqueurs HK1043 et F1. Ceci ne peut pas être expliqué par les liens physiques entre ces deux marqueurs qui sont localisés sur des chromosomes différents. Il est possible que ce déséquilibre de liaison au sein des deux clusters soit dû à l'effet de la sélection, de la migration ou du faible diversité de ces deux marqueurs. D'ailleurs, le marqueur F1 a amplifié 3 allèles sur l'ensemble de la population alors que le HK1043 n'a amplifié que deux allèles. Miedaner *et al.* (2013) ont également remarqué que les marqueurs F7 et HK1043 ont contribué au fort déséquilibre de liaison des populations étudiées. En excluant les données obtenues par ces deux marqueurs, Miedaner *et al.* (2013) ont constaté que les populations semblent être en équilibre de liaison. Le déséquilibre de liaison enregistré au sein des populations CU1 et CU2 de *F. culmorum* qui confirme la clonalité de cette espèce est en contradiction avec le niveau élevé de diversité génétique détecté et avec la présence des deux idiomorphes *MAT1-1* et *MAT1-2* dans les quatre populations étudiées. Ceci demeure inexplicable parce qu'aucun cycle sexué ou parasexué n'a été mis en évidence chez ce pathogène.

La diversité génétique observé à l'intérieure des clusters algériens CU1 et CU2 est de l'ordre de 87%. Ce résultat concorde avec des données obtenues par Pouzeshimiab *et al.* (2014) et Rebib *et al.* (2014) en utilisant des marqueurs SSR. Ces derniers ont rapporté que la diversité génétique à l'intérieur des populations de *F. culmorum* varie de 84% dans une population iranienne à 96,7% dans une tunisienne. En outre, une étude utilisant 25 marqueurs RAPD a révélé que 96,2% de la variabilité

génétique est observée au sein des populations (Gargouri *et al.*, 2003). Les valeurs de ϕ_{PT} , N_m , I , N_e et H obtenues sont plus élevées que celles rapportées par Pouzeshimiab *et al.* (2014). Les résultats des estimations de ϕ_{PT} et du N_m suggèrent une différenciation modérée des deux clusters algériens de *F. culmorum* et un flux de gènes modéré entre ces deux clusters. Par ailleurs, les valeurs de l'indice de Shannon, du nombre d'allèles efficaces et de la diversité des gènes par locus obtenues révèlent une diversité génétique plus élevée du CU2 par rapport au premier cluster.

Les données sur le flux de gènes, la différenciation et l'AMOVA obtenues lors de notre étude montrent une faible subdivision des populations de *F. culmorum* qui est causée principalement par la diversité génétique élevée au sein des populations et par la migration des gènes entre des pays séparés par de grandes distances. Ces résultats concordent avec ceux des études antérieures qui ont également rapporté des niveaux de diversité génétique et allélique élevés, une faible subdivision des populations et un flux de gènes élevé entre des populations de *F. culmorum* originaires de différentes pays (Miedaner *et al.*, 2013 ; Pouzeshimiab *et al.*, 2014 ; Rebib *et al.*, 2014). En plus, les estimations des paramètres de variabilité génétique des populations de *F. culmorum* sont très proches de celles rapportées chez l'espèce *F. graminearum* qui se reproduit sexuellement (Ward *et al.*, 2008 ; Kelly *et al.*, 2015). Les niveaux élevés de diversité génétique rapportés dans toutes ces études de populations de *F. culmorum* se reflètent par le nombre élevé d'haplotypes uniques, par le faible niveau de subdivision des populations et par la diversité génétique élevée détectée au sein des populations. Plusieurs auteurs ont suggéré que ce niveau élevé de diversité génétique observé au sein des populations de *F. culmorum* pourrait être dû à un cycle sexuel cryptique (Obanor *et al.*, 2010 ; Miedaner *et al.*, 2013 ; Rebib *et al.*, 2014).

L'étude de l'effet de la température sur la croissance mycélienne des 139 isolats algériens de *F. culmorum* a montré l'existence d'une différence significative des optima thermiques de croissance entre les isolats. L'optimum de croissance se situe à 25°C pour 123 isolats de *F. culmorum*, néanmoins 16 isolats présentent un optimum de croissance à 20°C. Aucune croissance n'a été enregistrée à 5 et à 35°C. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Wagacha et Muthomi (2007) qui ont constaté que l'optimum de la croissance mycélienne de *F. culmorum* se situe entre 20 et 25°C. Certains auteurs ont cependant montré que cet optimum se situe à 25°C (Brennan *et al.*, 2003 ; Hope et Magan, 2003 ; Palmero *et al.*, 2009). En plus de son effet sur la croissance mycélienne chez *F. culmorum*, la température semble également jouer un rôle primordial dans la sporulation, l'infection et la production des mycotoxines (Wagacha et Muthomi, 2007). Aucune relation n'a été observée entre les températures optimales de la croissance mycélienne des isolats et leurs structures

génétiques ou leurs origines géographiques qui se caractérisent par des conditions climatiques différentes.

Différentes méthodes d'inoculation ont été décrites pour l'évaluation de l'agressivité des espèces de *F. culmorum* sur collet. La technique d'inoculation adoptée dans cette étude est celle de Hajieghrari (2009). Elle consiste à déposer des explants à proximité de la semence du blé au moment du semis.

Les 139 isolats de *F. culmorum* obtenus à partir du collet et de l'épi de blé se sont avérés agressifs à l'égard des plantules des deux variétés de blé Vitron et HD 1220. Tous les isolats ont induit des brunissements au niveau du collet et des racines avec des indices de maladie différents. Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe aucune relation entre l'origine des isolats (épi ou collet) et leur degré d'agressivité. Tunali *et al.* (2006) et Kammoun-Gargouri (2010) ont rapporté que les isolats de *F. culmorum* originaires de l'épi causent également la pourriture du collet et qu'il n'existe aucune différence dans l'agressivité des isolats en fonction de leur origine. Cependant, ces auteurs ont constaté une différence d'agressivité entre les isolats de *F. culmorum*. Plusieurs travaux rapportent que les isolats du chémotype 3ADON sont plus agressifs sur collet que ceux producteurs du NIV. Cette corrélation n'a pas été observée au cours de cette étude au sein de la collection des isolats étudiés.

La technique d'inoculation utilisée, le stade végétatif de la plante, l'organe inoculé ainsi que les conditions environnementales influencent l'intensité des attaques. De ce fait, l'essai de l'évaluation de l'agressivité des 75 isolats de *F. culmorum* sur épi a été conduit au stade floraison ce qui facilite l'infection de l'ovaire. Les épis ont été inoculés par pulvérisation d'une suspension de spores. Les résultats obtenus ont révélé que tous les isolats testés ont montré des degrés d'agressivité variables. Cette différence d'agressivité entre les isolats de *F. culmorum* a été rapportée par Miedaner et Reinbrecht (2001) et Kammoun-Gargouri (2010). Dans notre étude, les estimations visuelles des symptômes de la fusariose de l'épi ont été suffisantes pour noter l'existence d'une variabilité de l'agressivité entre les différents isolats sans avoir recouru à l'évaluation des dommages causés sur les graines. Cette estimation a été complétée par le pourcentage de réduction du PMG des épis inoculés par rapport aux témoins. Les résultats ont montré l'existence d'une variabilité dans les pourcentages de réduction du PMG entre les isolats et une relation linéaire entre l'agressivité des isolats et leurs pourcentages de réduction du PMG, ces derniers augmentent avec l'augmentation des indices de la maladie. Kammoun-Gargouri (2010) a aussi noté l'existence d'une variabilité dans la réduction du PMG entre les isolats de *F. culmorum*.

Aucune corrélation entre l'agressivité de l'isolat et son chémotype n'a été enregistrée lors de cette étude. Cependant, plusieurs auteurs ont montré que les isolats producteurs du 3ADON sont plus agressifs sur épi du blé que ceux du chémotype NIV (Touati-Hattab *et al.*, 2016). Par ailleurs, aucune relation n'a été notée entre l'origine géographique de nos isolats et leur agressivité sur collet et sur épi. Ceci est conforme aux résultats obtenus par Mottalebi *et al.* (2016) qui ont comparé l'agressivité des isolats de *F. culmorum* provenant d'Italie, de Syrie et d'Iran sur collet de blé.

Les résultats des tests de l'agressivité des isolats de *F. culmorum* montrent que la variété HD 1220 est plus résistante à la pourriture du collet et à la fusariose de l'épi que la variété Vitron. Cette différence du comportement de ces deux variétés a été également constatée par Touati-Hattab *et al.* (2016). Plusieurs études ont suggéré que la résistance à la fusariose de l'épi est liée au contenu phénolique des épis du blé à maturité (McKeehen *et al.*, 1999 ; Siranidou *et al.*, 2002). Ces composés phénoliques sont également des inhibiteurs de la biosynthèse du 3ADON par *F. culmorum* (Boutigny *et al.*, 2009). Parmi ces composés phénoliques, l'acide férulique est généralement le plus présent dans les graines de blé dur ce qui suggère qu'il joue probablement un rôle dans la résistance à l'accumulation des trichothécènes (Boutigny *et al.*, 2009 ; Touati-Hattab *et al.*, 2016).

Conclusion

VI. CONCLUSION

Durant la dernière décennie, les conditions climatiques favorables ont conduit à un développement spectaculaire de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi dans notre pays. Cependant, très peu de données ont été disponibles sur la situation de ces maladies dévastatrices en Algérie. C'est dans ce contexte que ce travail a été entrepris dans le but d'étudier principalement les différents aspects liés à l'agent causal de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi qui prédomine en Algérie. Le travail réalisé au cours de cette thèse nous a permis d'avoir une vue d'ensemble sur ces deux maladies mais aussi d'avoir des données détaillées sur *F. culmorum* le principal agent causal associé avec ces deux maladies en Algérie.

Les résultats obtenus révèlent clairement que les symptômes du dessèchement des épis et du brunissement des collets observés lors des prospections d'avril-mai 2014 et 2015 sont dus à la présence du complexe d'espèces fongiques associé à la pourriture du collet et à la fusariose de l'épi. En effet, les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification morphologique qui permettent la discrimination entre plusieurs espèces. Au cours de ce travail, le séquençage du *TEFI- α* a permis d'identifier les isolats du genre *Fusarium* et de distinguer des espèces morphologiquement très semblables. En addition, l'amplification PCR des isolats de *Microdochium* par l'utilisation d'amorces spécifiques les a classés dans deux espèces *M. nivale* et *M. majus* qui sont morphologiquement identiques. Les identifications morphologiques et moléculaires des espèces isolées nous ont permis de mettre en évidence l'étiologie de ces deux maladies en Algérie. Plusieurs espèces ont été identifiées à des fréquences différentes. L'espèce toxigène *F. culmorum* s'est avérée comme l'agent le plus fréquent en Algérie (46% des isolats). Ce résultat est en forte concordance avec plusieurs travaux qui ont rapporté que l'espèce *F. culmorum* est la plus dominante dans les pays du bassin méditerranéen.

Le deuxième volet de cette étude a porté sur la caractérisation du potentiel toxigène des 139 isolats de *F. culmorum* par ASO PCR. Les résultats ont montré que tous les isolats sont toxigènes. En outre, la majorité des isolats testés (83%) sont du chémotype 3ADON. Ces résultats ont été confirmés par une analyse biochimique par GC-MS des toxines synthétisées par 134 isolats de *F. culmorum* sur un milieu de culture à base d'agmatine. La quantification des trichothécènes et de la culmorine produites *in vitro* révèle l'existence d'une différence dans le potentiel toxigène entre les isolats. Néanmoins certains isolats n'ont produit aucune toxine dans le milieu de culture à base d'agmatine. Ces isolats ont été inoculés sur un substrat à base de graines de riz, certains d'entre eux ont produit la

culmorine et le 3ADON à des niveaux très faibles. Au total, chez 15 isolats aucune toxine n'a été détectée *in vitro*. La dominance, en Algérie, de l'espèce *F. culmorum* et de son chémotype le 3ADON doit être prise en considération lors des études épidémiologiques de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi devant les différents travaux qui ont démontré que les isolats de ce chémotype sont hautement phytotoxiques. Par ailleurs, le nivalénol est considéré comme l'un des métabolites secondaires les plus toxiques aux cellules animales et il est associé à plusieurs troubles de la santé. Pour cela, il devient de plus en plus nécessaire d'établir une réglementation législative en Algérie compte tenu de la présence de ces deux toxines dans les céréales et leurs dérivés. En plus, étant donné son pouvoir toxigène potentiellement important la présence de l'espèce *F. pseudograminearum*, doit être également surveillée.

En parallèle, il a été montré que les deux types sexuels *MAT 1-1* et *MAT 1-2* sont présents en Algérie avec une prédominance du *MAT1-2*. La coexistence des isolats du type sexuel *MAT1-1* et des isolats du type *MAT1-2* a été observée au sein des régions et des champs et parfois même les plants. Avec la présence des deux types sexuels de *F. culmorum*, la reproduction sexuée est susceptible de constituer dans l'avenir une partie intégrante du cycle de reproduction de *F. culmorum* en Algérie.

De plus, trois populations de *F. culmorum* provenant d'Australie, d'Italie et des États-Unis ont été intégrées dans cette étude. Les caractérisations des chémotypes et des mating types de ces populations ont révélé que la situation dans ces trois pays est similaire à celle en Algérie où une dominance du chémotype 3ADON et une coexistence d'isolats des deux mating types ont été aussi enregistrées. Cependant, dans ces trois pays les teneurs en mycotoxines des aliments sont réglementées.

Par ailleurs, les marqueurs SSR utilisés pour étudier la diversité génétique des quatre populations de *F. culmorum* originaires d'Algérie, d'Australie, d'Italie et des États-Unis ont fait leur preuve dans l'étude de la diversité génétique de cette espèce. Ils ont permis d'une part de classer les isolats des quatre populations en deux clusters génétiques sympatriques, dans lesquelles les deux chémotypes et types sexuels sont représentés. À l'exception des États-Unis où uniquement le CU1 était présent, dans les trois autres pays les deux clusters sont répandus. D'autre part ils ont révélé que la majeure partie de la diversité génétique a été observée à l'intérieur des populations. Tous les paramètres de diversité génétique de ces populations estimés lors de notre étude montrent une faible subdivision des populations de *F. culmorum*, causée principalement par la diversité génétique élevée au sein des populations et par le flux des gènes entre des pays séparés par de grandes distances. Ce niveau élevé de diversité génétique observé au sein des populations de *F. culmorum* pourrait être dû à un cycle sexuel cryptique.

L'étude de l'effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats algériens de *F. culmorum* a montré l'existence d'une différence dans l'optimum de croissance entre les isolats. Cet optimum est situé à 25°C pour la majorité des isolats et à 20°C pour 16 isolats. En fin, l'agressivité de cette collection d'isolat a été évaluée sur collet des variétés Vitron et HD 1220 par inoculation du sol par des explants mycéliens. Cette étude a montré l'existence d'une variabilité dans l'agressivité entre les isolats testés sur la même variété. De plus la variété HD 1220 s'est avérée plus tolérante à la pourriture du collet que Vitron. Les résultats obtenus ont montré aussi qu'il n'y a pas de différence entre l'agressivité des isolats originaires du collet et de l'épi. Ces derniers induits également la pourriture du collet. Par ailleurs, l'agressivité d'une collection de 75 isolats sur épi des variétés Vitron et HD 1220 a été évaluée *in situ* sous conditions naturelles par inoculation d'une suspension de spores au stade floraison. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus lors du test sur collet. Ce résultat doit être exploité et la variété HD 1220 et les autres variétés de blé locales qui sont bien adaptées aux conditions climatiques algériennes doivent être intégrées dans les programmes de sélection afin de déterminer si ces variétés possèdent des QTLs de résistance à ces deux maladies. Jusqu'à maintenant aucune approche de sélection n'est capable de produire des cultivars à résistance complète vis-à-vis de la fusariose de l'épi.

Notre travail constitue une première étude globale menée sur la pourriture du collet et la fusariose de l'épi du blé en Algérie. Dans ce sens, il serait souhaitable d'étudier le développement et la distribution de la fusariose de l'épi et la pourriture du collet du blé sur plusieurs années dans les différentes zones de production du blé en Algérie et de surveiller l'évolution des fréquences des espèces impliquées dans ces maladies. De plus, il est nécessaire d'estimer les pertes sur les rendements engendrées par ces maladies en Algérie et mettre en place un système de contrôle et de surveillance des fusariotoxines.

Notre étude de la diversité génétique de l'agent causal de la pourriture du collet et de la fusariose de l'épi du blé le plus fréquent en Algérie *F. culmorum* ouvre la voie pour d'autres études de la dynamique des chémotypes et des mating types de *F. culmorum* dans le temps et également pour l'initiation sur les autres espèces associées à ces deux maladies.

Ainsi, l'élaboration en Algérie de stratégies de lutte efficaces vis-à-vis de ces deux affections est indispensable compte tenu des pertes économiques qu'elles causent par la réduction des rendements et la contamination des récoltes par les mycotoxines.

RÉSUMÉ

La fusariose de l'épi et la pourriture du collet du blé sont des maladies fongiques qui sévissent à travers le monde engendrant des pertes sur les rendements considérables. Les espèces de *Fusarium* qui sont leurs principaux agents causaux produisent des mycotoxines dangereuses à la santé humaine et animale. Les prospections des zones de production du blé réalisées en 2014 et en 2015 ont confirmé que *F. culmorum* est l'espèce dominante en Algérie. Pour une étude globale des types sexuels, des chémotypes et de la structure génétique, la collection algérienne a été complétée par d'autres originaires d'Italie, d'Australie et des États-Unis. Les amplifications par PCR ont révélé que les deux types sexuels de *F. culmorum* coexistent en Algérie et dans les 3 autres pays. L'identification des chémotypes des isolats de *F. culmorum* par ASO PCR a montré que le 3ADON est le chémotype prédominant dans les quatre pays. La quantification par GC-MS des toxines produites par les isolats algériens *in vitro* a confirmé les résultats de la ASO PCR et elle a également montré que la majorité des isolats testés ont coproduits le 3ADON ou le NIV et la culmorine. La diversité génétique de 182 souches de *F. culmorum* a été évaluée à l'aide de 9 marqueurs SSR. L'AMOVA révèle que 89% de la variation génétique était à l'intérieur des populations. L'analyse bayésienne des données SSR a identifié deux populations de distribution mondiale dans lesquelles les deux chémotypes et mating types étaient représentés. De plus, il a été noté que l'optimum de croissance mycélienne des isolats algériens est situé entre 20°C et 25°C. L'agressivité de ces isolats a été testée sur collet et sur épi des variétés de blé Vitron (blé dur) et HD 1220 (blé tendre), les résultats ont révélé l'existence d'une variabilité dans l'agressivité entre les isolats de *F. culmorum*. Ainsi la variété HD 1220 s'est avérée plus résistante que la variété Vitron.

ABSTRACT

Fusarium head blight and crown rot are worldwide diseases that affect wheat yields, caused mainly by several *Fusarium* species, noticed as potential producers of mycotoxins. Surveys of Algerian wheat production provinces conducted during 2014 and 2015 revealed that *Fusarium culmorum* was the dominant causal agent of these important diseases. To assess mating type idiomorph, trichothecene chemotype potential and global population structure, the Algerian strains were completed with preliminary collections from Italy, Australia, and the United States. A PCR assay for *MAT* idiomorphs revealed that *MAT1-1* and *MAT1-2* strains were segregating in the different countries. The ASO PCR assay indicated that the 3ADON trichothecene genotype was predominant in each of the four countries sampled. The GC-MS analyses of *in vitro* toxins production confirmed trichothecene genotype PCR data and demonstrated that most of the strains tested produced neither 3ADON or NIV and culmorin. Global population genetic structure of 182 strains was assessed using 9 SSRs markers. AMOVA of the data indicated that 89% of the variation was within populations. Bayesian analysis of the SSR data identified two globally distributed, sympatric populations within which both trichothecene chemotypes and mating types were represented. In addition, it was noted that the optimal growth temperatures of *F. culmorum* were 20°C and 25 °C. The aggressiveness of the isolates was tested on wheat collar and spikes of Vitron (durum wheat) and HD 1220 (common wheat) wheat cultivars, the results showed a variability in aggressiveness between *F. culmorum* isolates. The HD 1220 cultivar was more resistant than Vitron cultivar.