

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences biologiques"

Spécialité: "Biotechnologie Microbienne"

Présenté et soutenu publiquement par

- ASLAFI Abdelhamid
- DELLIL Abdanour
- MEKKI Slimane

Thème

Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans la région Tiaret.

JURY:

- | | |
|--------------------------------|---------------|
| - President : Dr.BENSAID M.O . | Grade « MCA » |
| - Promoteur : Dr. YEZLI W. | Grade « MCB » |
| - Examinatrice: Dr. MOULAY M. | Grade « MCA » |

Année universitaire: 2017 -2018

Remerciements

En premier lieu nous remercions "ALLAH" le tout puissant, de nous avoir donné la volonté, la force et la patience pour accomplir de ce modeste travail.

*Nos profonds remerciements et sincère gratitude s'adressent à notre encadreur **Dr. YEZLI Wassim**, pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

*Un grand merci à **Dr. BENSALIM M.O** qui nous a fait l'honneur de présider notre jury, qu'elle trouve l'expression de notre profond respect.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à **Dr. MOULAY M**, qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillance et nous en sommes très honoré*

Nous portons une importance particulière à remercier les techniciens du laboratoire de Microbiologie, pour tout le soutien et conseils.

Dédicace

Avec un énorme plaisir. Un cœur ouvert et une immense joie. Que je dédie ce modeste travail en signe de Respect, de Reconnaissance et d'Amour à :

*à mes chers et magnifiques **Parents**, qu'il me soit permis de leur exprimer toute ma gratitude qui m'ont toujours enseigné la persévérance dans mes études et leur encouragement constant pour moi .et leurs Amour, et leurs sacrifices, leur soutien moral et physique; que dieu les protège.*

A mes frère Mohamed, Abdelmadjid, Nasreddine

Et mes sœurs Khadîdja, Zouhra et Fatima ; Je vous dédie ce travail En leurs souhaitant beaucoup de succès dans la vie

Les fils de mes sœurs Abderrahman, Abdalilah, Khadîdja, Amina, Nour elhouda, Selsabil et Abdel Hadi et Mohamed Salah.

et tous ma familles Aslafi, Briki, Bakhout

A mon trinômes

« Abdenour et Slimane »

pour les moments les merveilleux qu'ils étaient inoubliables.

A meilleures mes camarades et mes amis de promotion surtout :

Ismail, Nabil, Haroun, Amine, Achour, Amhmed, Abdelwahab, Abdelkader, abdarzaq, Abdelhak, Nouredine, Mohamed, Ahmed, Abdenour, Omar.

En Enfin, je dédie tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques Lignes et qui ont contribué de près ou de loin par leur aide au bon

Déroulement de ce travail.

ABDELHAMID

Dédicace

*A travers mes prières je remercie **DIEU** le tout puissant et le miséricordieux pour m'avoir aidé et permis de finalise mon*

Je dédie ce travail à mes parents que je tiens à remercier affectueusement pour m'avoir accordé toute leur confiance, leur soutient et permis de faire de longues études. Aussi pour leur grande compréhension dans les ,moments difficiles, pour m'avoir supporté, aidée et encouragé. je m'excuse pour tous les tracas et stress que vous avez subi avec moi, en ces quelques lignes je vous exprime ma profonde reconnaissance « que dieu vous garde pour moi ».

De même façon je remercie mes frères et mes sœurs pour toute l'aide et la patience dont ils fait preuve et toute ma famille proche ou éloignée pour leur soutien moral.

*Merci pour mon trinôme **ABDELHAMID** et **SLIMANE** pour les moments les merveilleux qu'ils étaient inoubliables.*

Tout le respect à tous le personnes qui ont contribué de pré ou de loin a l'élaboration de ce mémoire.

A tous ceux qui nous ont soutenus, je dit merci.

ABDENOUR

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Au nom d'ALLAH clément et miséricordieux et que la salut d'ALLAH soit sur son prophète MOHAMED.

A mon chers père « SAID », mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis.

A ma très chers mère « MADI », source, de ma vie, d'amour et de tendresse qu'a pas cessé m' encourager et de prier pour moi . vous m'avez toujours aidé par conseils et vos sacrifices. Puisse Dieu le tout puissant t'accorder meilleure santé et bonheur.

A mes frères : « HAMID, KAMEL, RAHIM et HRAMZA » et ma sœur « TOURKIA », qui m'ont toujours enseigné la persévérance dans mes études. Merci pour tout l'amour que vous me portez et toute la confiance que vous m'accordez Merci pour votre assistance, votre compréhension.

A mes proche amis , « NOUR SADAM, BRAHIM et RIMA », Vous encouragements étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, où l'on a terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien moral. Merci pour tout l'amour que vous me portez et toute la confiance que vous m'accordez.

A mes oiseaux « YASER ABED HAMID, AMIR SAID et SOUNDOS »

A mon Trinôme, « ABED HAMID, ABD NOUR », Merci pour les très bon moments qu'on avait partagé ensemble.

SLIMANE

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii

INTRODUCTION

Chapitre I: Matériel et Méthodes

I.1. Objectif du travail.....	04
I.2. Lieu et date de travail.....	04
I.3. Matériel utilisé.....	04
I.3.1. Matériel biologique.....	04
I.3.2. Milieux de culture.....	04
I.3.3. Autre matériel.....	04
I.4. Protocole.....	06
I.4.1. Échantillonnage.....	07
I.4.2. Iselement des champignons a partir de différent grains de riz.....	07
I.4.3. Purification des isolats fongique.....	07
I.4.4. Identification des isolats fongique.....	08
I.4.4.1. Identification macroscopique.....	08
I.4.4.2. Identification microscopique.....	08
I.5. Lutte biologique.....	08
I.5.1. Confrontation directe.....	08
I.5.2. Confrontation indirecte.....	09
I.6. Analyses statistiques.....	10

Chapitre II: Résultats et Discussion

II.1. Isolement des champignons à partir des grains de riz.....	12
II.2. Identification des isolats fongique.....	13

II.2.1. Identification macroscopique.....	14
II.2.2. Identification microscopique.....	15
II.3. Lutte biologique.....	17
II.3.1 Confrontation directe.....	17
II.3.2 Confrontation indirecte.....	18
Discussion générale.....	20
Conclusion	24
ANNEXES.....	26
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34
RÉSUMÉS	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°01 :	Matériel et appareillages utilisé.	05
Tableau n°02 :	Pourcentage de la population fongique isolée du riz commercialisé dans la région de Tiaret.	12
Tableau n°03 :	Représentation de la distribution des isolats fongique dans commune .	13
Tableau n°04 :	Caractères macroscopiques des souches obtenues sur milieu PDA.	14
Tableau n°05 :	Caractères microscopiques des souches obtenues.	16
Tableau n°06 :	Diamètres moyens des souches témoins.	31
Tableau n°07 :	Diamètres moyens des souches en confrontation directe.	31
Tableau n°08 :	Diamètres moyens des souches en confrontation indirecte.	31
Tableau n°09 :	Pourcentages d'inhibition obtenus par confrontation directe.	32
Tableau n°10 :	Taux d'inhibition obtenus par confrontation indirecte.	32
Tableau n°11 :	Analyse de variance de la confrontation directe en fonction des souches.	32
Tableau n°12 :	Analyse de variance de la confrontation directe en fonction de la durée du traitement.	33
Tableau n°13 :	Analyse de variance de la confrontation indirecte en fonction des souches.	33
Tableau n°14 :	Analyse de variance de la confrontation indirecte en fonction de la durée du traitement.	33

LISTE DES FIGURES

Figure n° 01 :	Schéma du protocole expérimental	06
Figure n° 02 :	Isolement des moisissures avant l'incubation à partir des grains de riz sur milieu PDA.	07
Figure n° 03 :	Confrontation directe entre le champignon et l'agent antagoniste sur milieu PDA.	09
Figure n° 04 :	Confrontation indirecte entre le champignon et l'agent antagoniste sur milieu PDA.	10
Figure n° 05 :	Aspect macroscopique des moisissures à partir du riz sur milieu PDA.	13
Figure n° 06 :	Observation macroscopique d' <i>Aspergillus flavus</i> isolée à partir de la commune de Freneda.	14
Figure n° 07 :	Observation microscopique de <i>Rhizopus</i> isolée à partir de la commune de Tiaret (Gr400).	15
Figure n° 08 :	Inhibition du développement d' <i>A. flavus</i> par <i>T. harizanium</i> .	17
Figure n° 09 :	Taux d'inhibition des souches fongiques par confrontation directe avec <i>T. harizanium</i> .	18
Figure n° 10 :	Inhibition du développement du <i>Fusarium</i> par <i>T. harizanium</i> .	18
Figure n° 11 :	Taux d'inhibition des souches fongiques par confrontation indirecte avec <i>T. harizanium</i> .	19
Figure n° 12 :	Isolement des champignons à partir des grains de riz de chaque commune.	27

Figure n° 13 :	Observation macroscopique de la souche <i>T. harzianium</i> .	28
Figure n° 14 :	Observation macroscopique de la souche <i>A. niger</i> .	28
Figure n° 15 :	Observation macroscopique de la souche <i>Fusarium</i> .	28
Figure n° 16 :	Observation macroscopique de la souche <i>Rhizopus</i> .	29
Figure n° 17 :	Observation macroscopique de la souche de <i>Penicillium</i>	29
Figure n° 18 :	Observation microscopique de la souche <i>T. harzianium</i> (x40).	30
Figure n° 19 :	Observation microscopique de la souche <i>A.flavus</i> (x40).	30
Figure n° 20 :	Observation microscopique de la souche <i>Penicillium</i> (x40).	30
Figure n° 21 :	Observation microscopique de la souche <i>A.nger</i> (x40).	30
Figure n° 22 :	Observation microscopique de la souche <i>Rhizopus</i> (x40).	30
Figure n° 23 :	Observation microscopique de la souche <i>Fusarium</i> (x40).	30

LSITE DES ABREVIATIONS

A: *Aspergillus*.

ATB: Antibiotique.

DAM: Dahmmoni.

FR: Frenda.

HMD: Hamedia

KRM: karmen

MS: Machraa-sefa

PDA: Potato Dextrose Agar.

Sp : espèces

SR: Sidi-abdarhmman

T: *Trichoderma*.

HPLC : chromatographie liquide a haute performance.

Introduction

Les céréales constituent la base de l'alimentation dans de nombreux pays du monde, dont le riz est la céréale la plus cultivée dans le monde, après le blé. C'est un excellent aliment recommandée par la plus part des nutritionnistes et il occupe une place primordiale dans la consommation mondiale (Nguyen., 2007).

En point de vue nutritionnel, les grains de riz sont consommée entiers, décortiqués puis polis. Au cours de cette opération, le riz perd 75% de sa vitamine B1, 56% de sa vitamine B2. Cuit, le riz contient 70% d'eau, 2.5% de protéines et 25% de glucides. Il représente une bonne source de magnésium et aussi, il rentre dans la fabrication des boissons alcoolisées (le saké et le merlin japonais) (Derach . 1986).

La production de riz est assurée par une seule récolte dans l'année, alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage.

Le riz est contaminé lors de la récolte et du stockage par les moisissures, qui sont des champignons filamenteux hétérotrophes, et qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'Homme. Il existe plusieurs de ces moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* ayant une capacité de produire des métabolites secondaires toxiques (Cahagnier *et al.*, 1998 ; Doyle *et al.*, 1998 ; Meyer *et al.*, 2004). Les moisissures réduisant la valeur nutritionnelle, diminuent la qualité technologique et modifiant l'aspect organoleptique (Gacem. ,2012).

Les moisissures produisent un certain nombre de métabolites secondaires nocifs qualifiés de mycotoxines, ces dernières provoquent des problèmes à la santé publique par deux sens ; lorsqu'elles sont présentes dans l'alimentation humaine (directe) et lorsqu'elles contaminent la chaîne alimentaire via l'alimentation (indirecte) (Bejaoui., 2005).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par certaines souches de moisissures, leur développent principalement dans les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits). (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz., 2002). Les mycotoxines sont reconnues pour leurs caractères cancérigènes, immunosuppresseurs, œstrogènes, tératogènes etc. Elles peuvent aussi être à la base d'énormes pertes économiques à l'agriculture et aux industries agroalimentaires (Toffa., 2015).

L'orientation des recherches vers les moyennes biologique par l'utilisation de souches fongiques antagonistes comme une lutte biologique pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques, en raison de son efficacité et de son application facile et pratique et moins couteuse.

La lutte biologique est une alternative très prometteuse, grâce aux caractéristiques des agents microbiologiques dans les écosystèmes : l'ubiquité naturelle, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action ainsi leur persistance dans l'environnement (De Kouassi., 2001).

C'est dans cette perspective, qu'on a opté pour la recherche des moisissures mycotoxinogènes dans le riz commercialisé dans différentes régions de la wilaya de Tiaret, ainsi que d'étudier l'interaction de ces moisissures vis-à-vis l'agent antagoniste biologique *Trichoderma harzianum*, dans le but de contribuer dans l'amélioration des conditions de stockage.

Chapitre I :

MATÉRIEL & MÉTHODES

I.1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail est d'étudier la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxines isolée à partir des grains du riz et mettre en évidence l'activité biologique antagoniste de *T. harzianum* sur la croissance des moisissures mycotoxinogènes des grains de riz.

I.2. Lieu et date du travail

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn khaldoun-Tiaret, durant la période du 08 Février jusqu'au 30 Mars 2018.

I.3. Matériel utilisé

I.3.1. Matériel biologique

Pour réaliser ce travail nous avons utilisé dix échantillons de grains de riz, qui ont été collectées à partir de dix communes de la région de Tiaret (Rechaiga, Hamedia, Frenda, Ain Dheb, Machraa Safa, Sidi Abderahmen, Tiaret (Volani), Dahmouni, Tiaret (karman) et Medrissa).

I.3.2 Milieux de culture

Deux milieux synthétiques (Annexe 1) ont été utilisés pour l'isolement et la purification des moisissures à partir des grains de riz, ainsi que pour les tests de lutte biologique (PDA et Agar 2%).

I.3.3. Autre matériel

L'appareillage et la verrerie utilisés dans notre travail sont illustrés dans le Tableau 1.

Tableau n°01 : Matériel et appareillages utilisé.

Appareillages	Produit	Autres
<ul style="list-style-type: none"> - Microscope optique «OPTIKA» - Vortex «TECHNO KARTELL» - Incubateur «MEMMERT 854 SCHWABACH W-GERMANY» - Autoclave «WOLF WESKZEUG-VORRICHLUNGSUN 7340 GEISLINGEN» - Agitateur «IKAMAG» - Bain marie «MEMMERT» - Balance magnétique «KERN 440-45N » - Four Pasteur «HERAEUS» 	<ul style="list-style-type: none"> - Alcool - Bleu méthylène - Eau distillée stérile - Hypochlorite de sodium (Eaux de javel) - ATB (cefazoline) 	<ul style="list-style-type: none"> - Bec Bunsen - Barreau magnétique - Boîtes de Pétri - Lance de platine - Pince de platine - Pissettes - Portoir de tube a essais - Tubes à essai - Flacons -Béchers - Éprouvettes - Pipette Pasteur - Ruban adhésif

I.4. Protocole expérimental

Dans ce travail, nous avons choisi la culture de riz comme matériel végétal. Le protocole expérimental de notre travail est résumé dans la **figure 01**:

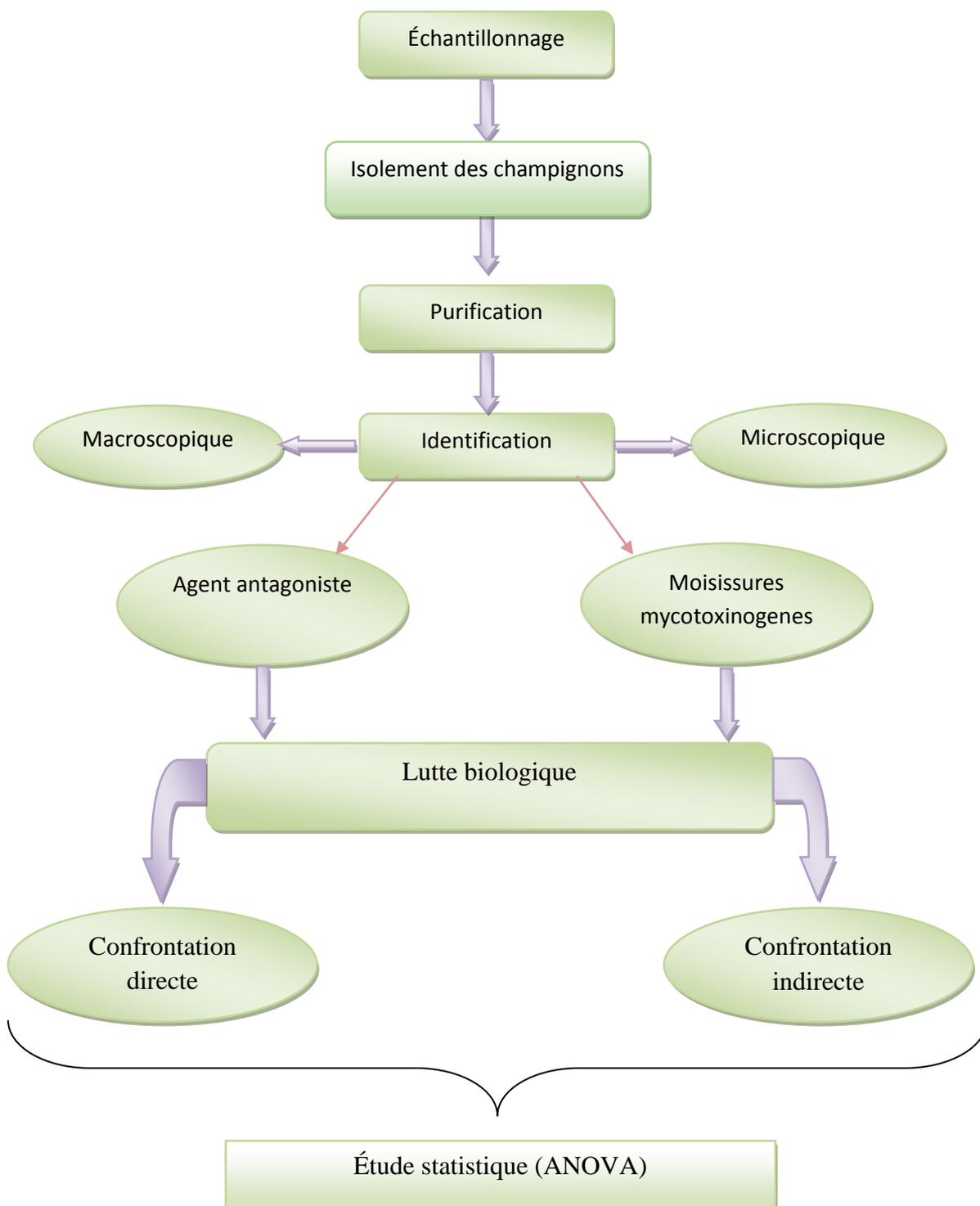


Figure n° 01 : Schéma du protocole expérimental.

I.4.1. Échantillonnage

Les analyses ont été effectuées sur des grains de riz, qui ont été collectées à partir de dix communes de la région de Tiaret (Rechaiga, Hamedia, Frenda, Ain Dheb, Machraa Safa, Sidi Abderahmen, Tiaret (Volani), Dahmouni, Tiaret (karman) et Medrriassa). Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier.

I.4.2. Isolement des champignons à partir des grains de riz

L'isolement a été réalisé en se basant sur la technique celle décrite par Davet et Rouxel (1997) avec quelques modifications. Nous avons désinfecté les grains de riz avec l'hypochlorite de sodium (l'eau de javel 13° dilué à 30 %) pendant trois minutes, pour éliminer les bactéries. En suite, les grains de riz ont été rincés trois fois avec l'eau distillée stérilisée pour éliminer les traces de l'eau javel. Après, nous avons déposé dix grains de riz pour chaque échantillons dans une boîte Pétri contenant le milieu PDA plus ATB (cefazoline). Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 72 heures (Figure 02).

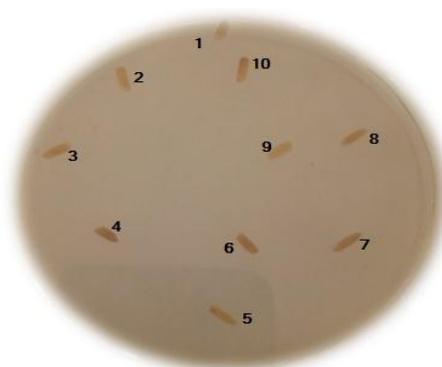


Figure n°02 : Isolement des moisissures avant l'incubation à partir des grains de riz sur milieu PDA.

I.4.3. Purification des isolats fongique

La Purification a été réalisé par technique de culture monospore décrite par Henni *et al.* (1994) avec quelques modifications. Dans cette technique nous avons prélevé un fragment de mycélium, qui a été introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérilisée. Après une agitation vigoureuse au vortex (pour libérer les conidies), nous avons réalisé des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} . En suite, nous avonsensemencé en surface, un volume de 0.1 ml sur milieu gélosé Agar 2 %, à l'aide d'un râteau. Après incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures, nous avons repiqué les germinations issues d'une seule et unique conidie sur une boîte de

Pétri contenant le milieu PDA plus ATB (cefazoline). Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours.

I.4.4. Identification des isolats fongique

L'identification des champignons contaminants les grains de riz repose sur :

I.4.4.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique repose sur l'étude des caractères culturels basés sur des observations à l'œil nu. Les caractères étudiés sont: la pigmentation de la face et de l'envers des colonies, la vitesse de croissance, le contour des colonies et l'aspect du mycélium en prenant en considération le morphotype (Nelson., 1981 et Booth, *et al.*, 1984).

I.4.4.2. Identification microscopique

L'identification microscopique a été réalisée en utilisant la technique de drapeau décrite par Guezlane-Tebibel *et al.* (2011). Nous avons prélevé une empreinte fongique des extrémités des colonies fongiques à l'aide d'un fragment de ruban adhésif. En suite, nous avons recollé le ruban sur une lame contenant une goutte de bleu de méthylène. Après, on est passé directement aux observations par microscope optique aux différents grossissements (Gr 100 et 400).

I.5. Lutte biologique

La mise en évidence de l'effet antagoniste vis-à-vis les moisissures pathogènes a été réalisée en utilisant un champignon antagoniste, utilisé en lutte biologique qui a été identifié comme *T. harzianum* et qui a été isolé à partir de nos échantillons de riz, présentant une dominance de 100%. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques :

- la confrontation par contacte directe.
- la confrontation à distance.

I.5.1. Confrontation directe

Cette technique permet de mettre en évidence l'effet inhibiteur direct de *T. harzianum* exercé sur des différents isolats, par compétition sur les nutriments, sécrétions de métabolites et essentiellement le mycoparasitisme (Hibar *et al.*, 2005). Dans cette technique, nous avons déposé deux disques gélosés de 5 mm, correspondant à agent antagoniste et champignon

mycotoxinogène dans la même boîte de Pétri contenant le milieu PDA plus ATB (cefazoline). Les deux disques ont été placés sur un axe horizontal à 3 cm de distance. Les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 5 jours. Le témoin contient le pathogène seul au centre de la boîte de Pétri sur le même milieu PDA (Figure 03).

Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de ce dernier cultivé en présence et en absence de l'antagoniste. Cette évaluation est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (Hmouni.,1996 *et al*), selon la formule suivante:

$$I (\%) = (1 - C_n/C_o) \times 100$$

- **C_n** : est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste ;
- **C_o** : est le diamètre moyen des colonies témoins.

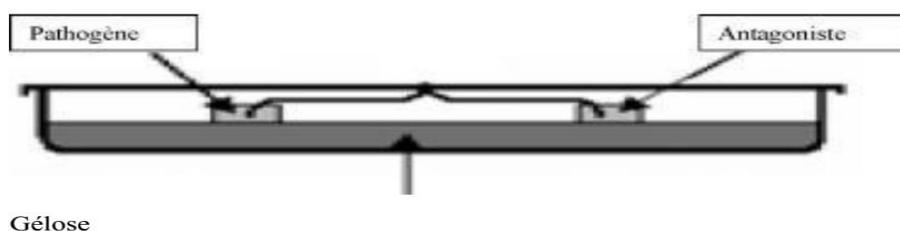


Figure n°03 : Confrontation directe entre le champignon et l'agent antagoniste sur milieu PDA.

I.5.2.Confrontation indirecte

Cette technique consiste à évaluer l'effet des substances volatiles secrétées par l'antagoniste sur la croissance du pathogène (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001). Dans cette technique nous avons placé dans deux boîtes de Pétri séparées contenant le milieu PDA plus ATB (cefazoline), deux disques gélosés (l'agent antagoniste et le champignon pathogène). En suite, nous avons assemblé les deux socles des boîtes de Pétri, de façon à ce que l'antagonistes soit en bas et le pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes a été assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. L'incubation a été réalisée à 28°C pendant 5 jours. Le témoin contient le pathogène seul au centre de la boîte de Pétri sur le même milieu PDA (Figure 04).

Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies des isolats cultivés en présence et en l'absence de l'antagoniste. L'évaluation de l'inhibition exercée par l'antagoniste a été estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (Wang *et al.*, 2002), selon la formule suivante:

$$I = [(R_t - R_{ts}) / R_t] \times 100$$

- **I** : Pourcentage d'inhibition
- **R_t** : distance radiale maximale de la croissance du champignon (témoin).
- **R_{ts}** : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste (test).

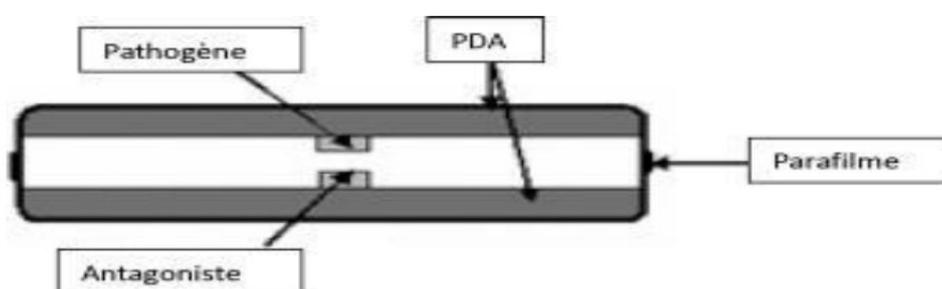


Figure n° 04: Confrontation indirecte entre le champignon et l'agent antagoniste sur milieu PDA.

I.6. Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats expérimentaux et la représentation graphique ont été effectuées par le logiciel : Microsoft Office Excel 2007. Pour étudier la signifiante de nos résultats expérimentaux, on a utilisé l'analyse de la variance (ANOVA). Cette méthode consiste à mettre en évidence l'effet d'un/des facteur(s) sur la croissance et l'inhibition fongique. Dans ce contexte, le seuil de signification considéré est de 5 % ($P < 0.05$).

Chapitre II

Résultats & discussion

II. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons isolé et identifié les moisissures toxigènes des grains de riz dans dix communes de la wilaya de Tiaret.

II.1. Isolement des champignons à partir des grains de riz

Après 7 jours d'incubation à 25 °C, la croissance fongique au tour des grains de riz a été observée dans 7 communes avec différents pourcentages indiquée dans Figure 05 et Tableau 02. Nous avons obtenus au total six (6) isolats fongiques.

Tableau n° 02: Pourcentage de la population fongique isolée du riz commercialisé dans la région de Tiaret.

Région	Pourcentage de la population fongique
Tiaret	20 %
Dahmmoni	15 %
Karmane	15 %
Hammadia	30 %
Sidi Abdarhmen	25 %
Rechaiga	0 %
Mechera Sfaa	15 %
Medrissa	0 %
Ain Dheb	0 %
Frenda	10 %



Figure n° 05: Aspect macroscopique des moisissures à partir du riz sur milieu PDA.

II.2. Identification des isolats fongique

Les résultats de la purification par culture monospore, nous ont permis d'identifier les six isolats fongiques obtenus, sur le plan macroscopique et microscopique. Les principaux genres identifiés sont : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Les genres obtenus sont représentés sur le Tableau 03.

Tableau n° 03 : Représentation de la distribution des isolats fongique dans chaque commune.

Région	Isolats
Tiaret	<i>Rhizopus</i>
Dahmmoni	<i>T. harzianum</i>
Karmane	<i>A.niger</i> et <i>Penicillium</i>
Hammadia	<i>Penicillium</i> et <i>Rhizopus</i>
Sidi abderhamen	<i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i>
Mechera sefaa	<i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i>
Frenda	<i>A. flavus</i>

II.2.1. Identification macroscopique

Identification macroscopique, nous a permis d'observer six souches avec différents morphotypes cultivées sur le milieu PDA. Parmi les six souches isolées, nous avons obtenus une souche considérée comme agent antagoniste (*T. harzianum*), utilisé dans les tests de lutte biologique. Et après obtenus aussi quatre moisissures mycotoxinogènes (*Fusarium*, *A. niger*, *A. flavus* et *Penicilium*). La sixième souche (*Rhizopus*) est considérée comme l'ennemie de l'industrie agro-alimentaire, mais elle ne secrète pas des mycotoxines. Les observations macroscopiques sont illustrées sur la Figure 06. Les différents morphotypes obtenus, ainsi que les différentes pigmentations des souches sont représentés sur le Tableau 04.

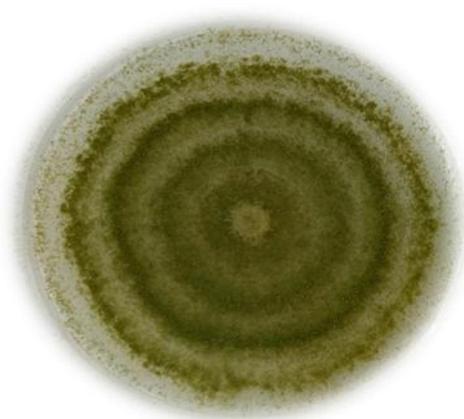


Figure n° 06 : Observation macroscopique d'*A. flavus* isolée à partir de la commune de Frenda.

Tableau n° 04: Caractères macroscopiques des souches obtenues sur milieu PDA.

Moisissures	Aspect macroscopique
<i>T. harzianum</i> (TH)	- F : Colonies floconneuses, croissant rapidement, d'une pigmentation jaune-verdâtres au centre avec des extrémités blanches. - E : Non pigmentée.
<i>A. flavus</i> (AF)	- F : colonies duveteuses à poudreuses, d'une pigmentation verdâtres au centre et des extrémités blanches - E : Non pigmentée.
<i>A. niger</i>	- F : colonies granuleuses, d'une pigmentation noirâtre avec un

(AN)	contour blanc. - E : Non pigmentée.
<i>Fusarium</i> (FM)	- F : Colonies duveteuses, d'une pigmentation blanche- rose saumon à violette. - E : Pigmentation pourpre.
<i>Penicilium</i> (PM)	- F : Colonies poudreuses, avec une pigmentation blanche à bleu-vert. - E : Pigmentation jaunâtre.
<i>Rhizopus</i> (RS)	- F : Colonies à croissances très rapide, cotonneuse, avec une pigmentation grise foncées en vieillissant. - E : Non pigmentée.

F : La face de la colonie ; E : l'envers de la colonie.

II.2.2. Observation microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique a été réalisé après par technique de drapeau sur les isolats obtenus après la purification. Cette examen microscopique a été réalisé pour mettre en évidence : l'aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...). Les résultats sont illustrés dans la Figure 07 et le Tableau 05.

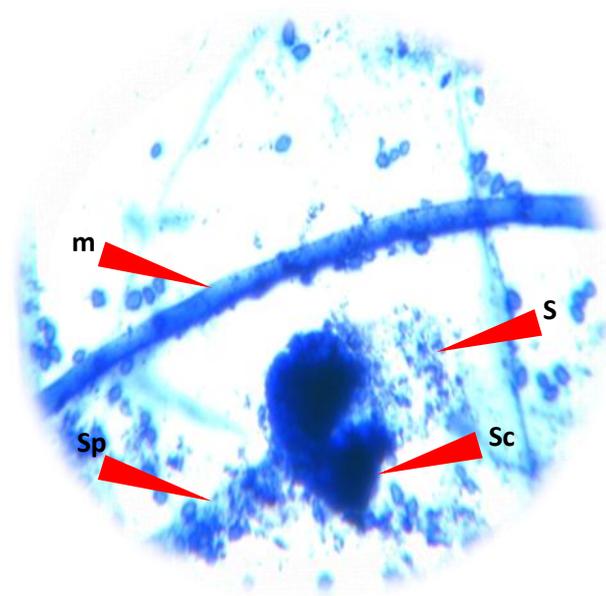


Figure n°07 : Observation microscopique de *Rhizopus* isolée à partir de la commune de Tiaret (Gr 400).

m : mycélium siphonné ; S : spores dispersées ; Sc : sporocyste ; Sp : sporocystophore.

Tableau n° 05 : Caractères microscopiques des souches obtenues.

Espèce fongique	Identification microscopique
<i>T. harzianum</i> (TH)	- Conidiophores branchus. - Phialides libérant des conidies rondes groupées en amas sphérique.
<i>A. flavus</i> (AF)	- Tête aspergillaire unisériée. - Phialides directement portées par la vésicule. - Conidies globuleuses. - Conidiophore long. - Vésicule sphérique.
<i>A. niger</i> (AN)	- Tête aspergillaire globuleuse et radiées. - conidiophore lisse. - Phialides insérées sur la vésicule par les métules disposées surtout le pourtour de la vésicule. - Conidies globuleuse, échinulées, souvent déposé en chaine.
<i>Rhizopus</i> (RH)	- Filaments larges non septés. - Chlamydo-spores peuvent être présentes, isolées ou disposées en chaînes. - Stolons, rhizoïdes et sporocystophores sont bien différenciés.
<i>Fusarium</i> (FM)	- Macroconidies sous forme de fuseau. - Microconidies sous forme d'une virgule. - Chlamydo-spores rondes, épaisses regroupées en chaine ou isolées.
<i>Penicillium</i> (PM)	- Mycélium septé. - Conidiophore en pinceau. - Phialides à l'extrémité des ramifications. - Conidies rondes et lisse.

II.3. Lutte biologique

L'activité antifongique consiste à évaluer l'effet de l'antagoniste sur le développement des souches obtenues. Le potentiel antagoniste du mycoparasite *T. harzianum* a été testé vis-à-vis quatre moisissures mycotoxinogènes (*Fusarium*, *A. niger*, *A. flavus* et *penicilium*).

II.3.1. Confrontation directe

Après le suivi des résultats de la confrontation directe entre *T. harzianum* et les agents pathogènes. Nous avons remarqué une croissance mycélienne importante de l'agent pathogène lorsqu'il est cultivé seul sur milieu PDA (témoin), par rapport aux boîtes tests, où le pathogène est en présence de l'antagoniste.

Au bout de trois jours d'incubation à 28 °C, les boîtes ont été totalement occupées par l'antagoniste (Figure 08), ce qui correspond à une inhibition de la croissance des souches fongiques testées, alors que les isolats de pathogènes n'occupent qu'une surface qui varie entre 7.05 et 23.52 % de la surface totale de la boîte de Pétri, comparées aux boîtes témoins où les pathogènes occupent une surface qui varie entre 11.76 et 47.05%. En effet, l'étude statistique montre que toutes les souches pathogènes sont significativement inhibées par *T. harzianum* ($P < 0.05$) et cette inhibition n'est pas influencée par la durée du traitement ($P > 0.05$) (Figure n° 09 et Tableaux n° 11 et 12 en Annexe 03).

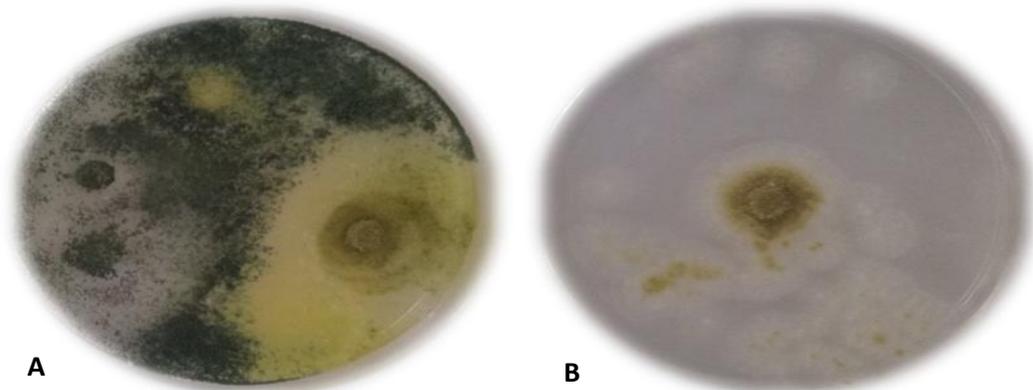


Figure n° 08 : Inhibition du développement d'*A. flavus* par *T. harizanium*.

A : Test ; B : Témoin.

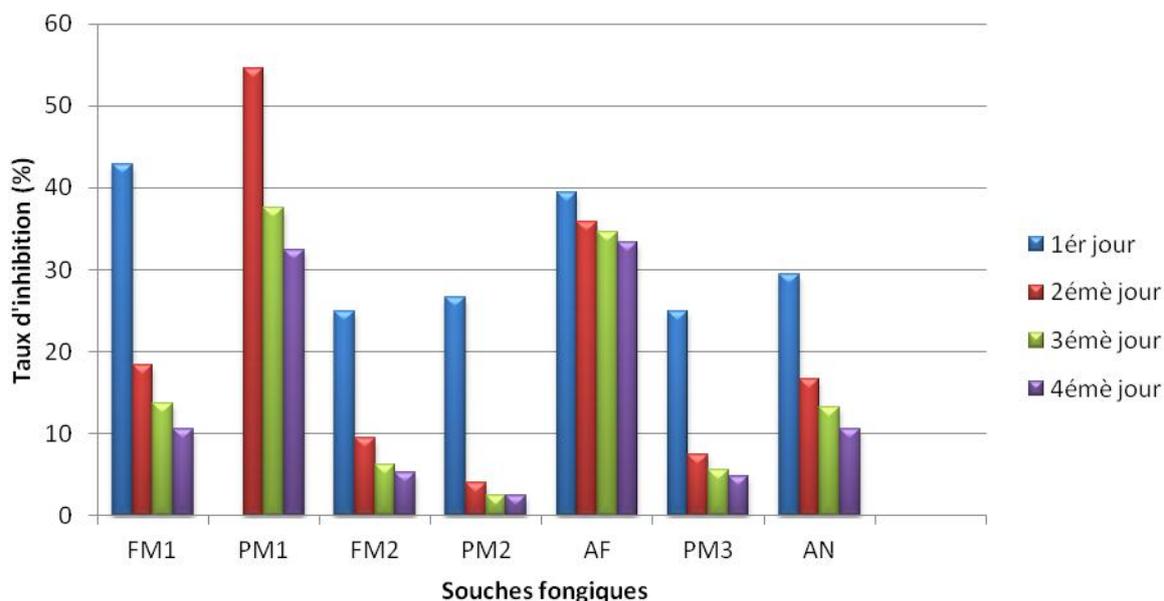


Figure n° 09 : Taux d'inhibition des souches fongiques par confrontation directe avec *T. harzianum*.

II.3.2. Confrontation indirecte

Les résultats obtenus montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches pathogènes exercé par la souche antagoniste de *T. harzianum* comparativement aux témoins (Figure 10). Au bout du quatrième jour d'incubation à 25 °C, nous avons remarqué un ralentissement de la croissance des souches mycotoxinogènes par rapport aux témoins, correspondant à une inhibition de leur croissance, par les substances volatiles de *T. harzianum* sur milieu PDA. En effet, l'étude statistique montre que toutes les souches pathogènes sont significativement inhibées par *T. harzianum* ($P < 0.05$) et cette inhibition n'est pas influencée par la durée du traitement ($P > 0.05$) (Figure n° 11 et Tableaux n° 13 et 14 en Annexe 03).



Figure n° 10 : Inhibition du développement du *Fusarium* par *T. harzianum*.

A : Test ; B : Témoin

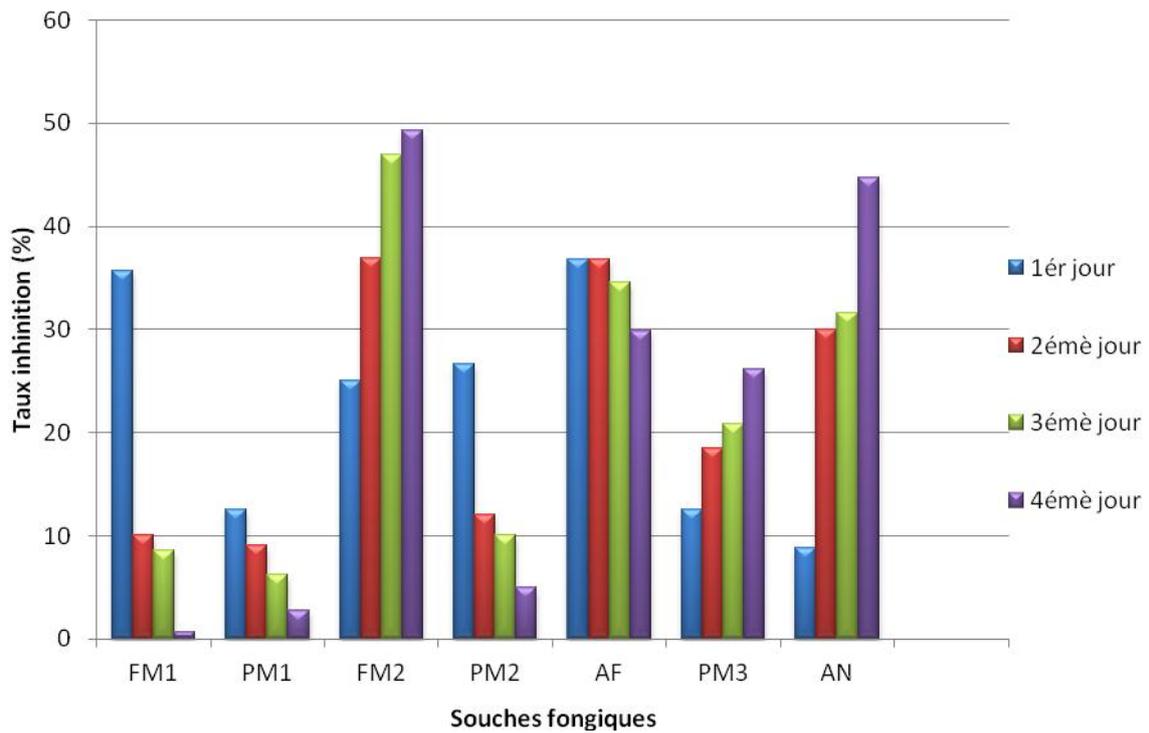


Figure n° 11 : Taux d'inhibition des souches fongiques par confrontation indirecte avec *T. harzianum*.

Discussion générale

Le présent travail été dans la conception de l'identification des moisissures productrices des mycotoxines dans la wilaya de Tiaret. L'altération des céréales stockés a fait l'objet de nombreuses études ayant mise en évidence, que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des graines des céréales, expliquée par des variation dans les paramètres technologique du grain et par les pertes considérable (Atalla et *al.*, 2003) .

Les résultats de la caractérisation morphologique macroscopique et microscopique de nos souches (*A. niger*, *A. flavus*, *Fusarium* sp. et *Penicillium* sp.), qui ont été étudié sur milieu PDA, le plus communément utilisé à cet effet (Botton., 1990), ont fait apparaître cinq morphotypes différents : l'aspect cotonneux, granuleuse, duveteux, floconneuse et poudreux. En ce qui concerne la morphologie du thalle et la pigmentation, les résultats obtenus relèvent une nette variabilité entre toutes les souches. Les variations portent sur des caractères culturaux (aspect du mycélium aérien et la pigmentation du thalle); et des organes fructifères (phialides, conidiophores et les conidies).

Les résultats de la caractérisation morphologique de la souche *Fusarium* sp., montrent que les colonies ont une forme duveteuse ou cotonneuse de pigmentation variable (blanche, rose, rouge ou violette). La présence du thalle végétatif naissent des conidiophores courts et ramifiés, se dernier portent les phialides. On distingue deux types de conidies : des microconidies et les macroconidies. Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par (Chermette et Bussieras. , 1993 ; Chabasse et *al.*, 2002).

L'étude macroscopique de la souche *Penicillium* sp., sur milieu gélosé a démontré que les colonies ont une teinte vert bleu, vert gris, gris-bleu. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification. L'envers des colonies peut être incolore, jaune pale. Ces aspects déjà décrits dans les travaux de Chermette et Bussieras, (1993) et Chabasse et *al.* (2002), montrent que l'aspect microscopiques s'avère qu'il y a une présence des hyphes septés, hyalins, portent des conidiophores simples ou ramifiés. Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les conidies sont rondes à ovoïdes, hyalines ou pigmentées, lisses ou échinulées.

Les résultats obtenus sur la souche d'*A. niger*, montrent que la surface des colonies est granuleuses, d'une pigmentation noire, avec un contour blanc et l'envers non pigmenté, et l'aspect microscopique montre la présence d'une tête aspergillaire globuleuse avec

conidiophore lisse, conidies globuleuse, échinulées, souvent déposées en chaîne. Nos résultats se rapprochent de ceux de (Raper et Fennell, 1965 ; Ottaviani et *al.*, 1988 ; Guiraud, 1998 ; Botton et *al.*, 1999; Jernejc. , 2001).

L'observation macroscopique et microscopique de la souche *A. flavus*, permettent de considérer que la surface des colonies est duveteuse à poudreuse, avec une pigmentation blanche, puis vert jaune, et l'envers est incolore. Par ailleurs, l'aspect microscopiques montre des conidiophores longs, vésicule sphérique, les phialides sont directement insérées sur la vésicule ou portées par des métules, les conidies sont globuleuses a sub-globuleuses, la tête aspergillaire est unisériée. Ces observations sont confirmées par l'étude de Chabasse et *al.* (2002).

Le potentiel des espèces de *Trichoderma* sp., comme agents de lutte biologique, contre les maladies des plantes a été identifié la première fois pendant les années 1930. Pendant des années, l'antagonisme de *T. harzianum* a été étudié contre plusieurs maladies des plantes (Wells et *al.*, 1972 ; Schirmbock et *al.*, 1994 ; Elad et Kapat, 1999 ; Yedidia et *al.*, 2001 ; Roco et Péres, 2001 ; Ozabhy et Newman, 2004).

Les tests de lutte biologique ont été réalisés dans le but de réduire la contamination des grains de riz par les moisissures et les mycotoxines.

Les résultats qui ont été obtenus par des tests d'antagonisme, par confrontation directe en utilisant une souche de *T. harzianum*, montrent un effet inhibiteur sur les isolats fongiques. Ces résultats sont conformes avec les travaux de Dubos (1985) et Davet (1986). Alors que, les colonies des différents isolats pathogènes n'occupe qu'une très petite surface comparativement au témoin, ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne ce qui s'avère être que les résultats sont similaires avec l'étude de (Zhihe et *al.*, 1988 ; Hibar et *al.*, 2005), qui ont prouvé que *Trichoderma* sp. produit des substances agissant comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène.

Au bout de quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste et sporule même sur le pathogène, L'envahissement du mycélium du pathogène par *T. harzianum* a également été observé par (Benhamou, Chet, 1996 ; Daami-Remadi, 2001 ; Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001).

Les résultats obtenus, concernant le test antagoniste à distance, montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches pathogènes exercé par la souche

antagoniste *T. harzianum*, comparativement aux témoins. Malgré l'absence d'un contact direct, entre les isolats pathogènes et l'antagoniste test, ce dernier a pu exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies des pathogènes. Cela correspond aux travaux de Hibar *et al.* (2005), qui ont montré que *Trichoderma* sp. est apte à produire des substances volatiles, qui ont la capacité de limiter et stopper le développement de l'agent pathogène.

D'après Dennis et Webstres (1971), les *Trichoderma* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine, présentes sous forme de substances volatiles importantes. Ces mêmes résultats ont été constatés par Meslouhi (1989).

Les tests de confrontation directe et indirecte montrent que la souche antagoniste *T. harzianum*, sont capables de produire des substances volatiles (confrontation indirecte) et des substances diffusibles (confrontation directe) inhibitrices de la croissance mycélienne des pathogènes. Cependant, les métabolites diffusibles sont hautement plus efficaces que les métabolites volatiles, qui ont été constatées par la comparaison des taux d'inhibition. Ces résultats sont conformes avec les travaux d'Asheafizad *et al.* (2005) ; Dubey et Suresh (2007), Akrami *et al.* (2011) et Saran Sundar (2013).

Conclusion

Ce travail consiste à une étude des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques de la flore fongique responsable de la contamination de riz dans différentes communes de la wilaya de Tiaret. En effet, une réalisation d'un isolement, suivie par une purification des moisissures productrices des mycotoxines, a montré la présence de : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Rhizopus*.

Les essais de confrontation entre les souches mycotoxinogènes et *T. harzianum*, que ce soit par confrontation directe sur milieu de culture, ou bien à distance, ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne des différents pathogènes testés. Cela montre, qu'en plus de son pouvoir mycoparasitaire, *T. harzianum* peut agir par la sécrétion de substances volatiles, qui sont capables d'inhiber à distance le développement de l'agent pathogène.

Comme perspectives, nous pouvons dire qu'il reste de tester cet effet antagoniste *in vivo* en utilisant la souche de *T. harzianum* sélectionnée, ainsi que d'identifier les mycotoxines secrétées dans nos échantillons par HPLC, pour que nous puissions contribuer à la prévention contre les pathogènes et assurer la conservation lors du stockage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait-Lahsen, H., Soler A., Rey M., De La Cruz J., Monte E. and Llobell A. (2001). An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5833-5839.
- Ashrafizadeh, A., Etebarian H.R., Zamanizadeh H.R. (2005). Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. *Iran. J. Phytopathol.* 41: 39-57.
- Atalla, M.M., Mohamed-Hassanein, N., Atef-Elbeih., A and Yoyssef, A. (2003). Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergillus* relation to different relative humidity and storage periods. *Food Nahrung.* p: 6-10.
- Bejaoui, H. (2005). Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. Thèse de doctorat d'université : Génie des procédés et de l'environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2005. 228p.
- Benhamou, N., Chet I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Bennett, J.W. (1985). Taxonomy of fungi and biology of the *Aspergilli*. *Appl. Microbiol.* 28: 362-365.
- Booth, C. (1984). The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. In *The applied mycology of Fusarium*. Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College, London, September 1982. (pp. 1-13). Cambridge University Press.
- Botton, B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- Bouhot, D., & Billotte, J. M. (1964). Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. II. Choix d'un milieu nutritif pour l'isolement selectif des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* du sol. *Ann. Epiphyties*, 15(1), 57-72. In : Djerbi, M. (1982). Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal*, 1(2), 153-197.
- Chabasse, D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P. (2002). Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale. 161 :78-85
- Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., Frémy, J.M., Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D., & Roquebert, M.F. (1998). Moisissures des aliments peu hydrates. *Lavoisier Tec&Doc*, France.

- Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, *Tec&Doc*. France.
- Chermette, R., Bussieras J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Daami-Remadi, M. (2001). Lutte biologique contre les *Fusarium spp.* agents pathogènes responsables de la pourriture sèche des tubercules de pomme de terre. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies en Protection des Plantes et Environnement .Tunisie : École supérieure d'Horticulture et d'Élevage de Chott Mariem, 72 p.
- Daami- Remadi, M., & El Mahjoub, M. (2001). Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. l'INRA*. 74: 167-186.
- Dai, Z., Mao, X., Magnuson, J. K. & Lasure, L. L. (2004). Identification of genes associated with morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4): 2474-2485.
- Davet, P. (1986). Activité parasitaire des *Trichodermas* vis-a-vis des champignons à sclérotés; corrélation avec l'aptitude a la compétition dans un sol non stérile. *Agronomie*. 6 (9) : 863-867.
- Davet, P., & Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Editions Quae.
- De Kouassi. (2001). Les possibilités de la lutte microbiologique : Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo*: 2 : 2.
- Denis, C., & Webster, I. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48.
- Derach, R. (1986). Toxicologie et sécurité des aliments, Technique et documentations, Paris, P28.
- Downes, P., & Ito, F. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *American Public Health Association*. (No. 579.67).
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. , Montville, T. J. (1998). Food microbiology: Fundamentals and frontiers. *ASM press*. Washington D.C.
- Dubey, S.C., & Suresh, M.S. (2007). Evaluation of *Trichoderma* Species Against *Fusarium Oxysporum F. Sp. Ciceris* For Integrated Management Of Chickpea Wilt. *Biol. Contamin.* 40: 118-127. 92.

- Dubos, B. (1985). L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plombes arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, 35-49. INRA, Paris.
- Elad, Y. & A. Kapat. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant pathology* 105: 177-189.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma spp.* on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *phytopathology*, 73:85-88.
- Gacem, M.A., Ould El Hadj K.A. & Gacemi B. (2012). Étude de la qualité physicochimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Alg.J.Env. p* :67-76.
- Guezlane-Tebibel, N., Kahlouche, B., & Athmani-Guemouri, S. (2011). Microbiologie (Travaux pratiques). 4ème édition corrigée, OPU. Algérie.
- Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.
- Henni, J., Boisson, C. & Geiger, J. P. (1994). Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathologia Mediterranea*, 33: 51-58.
- Hibar, K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M., (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (3), 163–171.
- Hmouni, A., Hajlaoui, MR. & Mlaiki, A. (1996). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26, p. 697–705.
- Jackson, C.R. (1962). *Aspergillus* crown rot of peanuts in Georgia, seed treatment fungicide for control of seedborne fungi in peanut. *Plant Disease Reporter*. 46: 888-892.
- Jernejc, K. & Cimerman A. (2001). Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol.* 39 (4): 333-340.
- Maslouhi, A. (1989). Contribution à l'étude *in vitro* des antagonistes de *Fusarium oxysporum* F. sp. *Albedinis*, agent causal du Bayoud, pp 4-8. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc).
- Meyer, A., Deiana, J. & Bernard, A. (2004). Cours de microbiologie générale. *Doin*. France.

- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Cook, R. J. (Eds.). (1981). *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy* (p. 457). University Park: Pennsylvania State University Press. In : Ma, L. J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., & Houterman, P. M. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373.
- Nguyen, M, T. M. (2007). Identification des espèces de moisissure Potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale de Vietnam- étude des condition pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de Doctorat d'état. Université de Toulouse, France, p.147.
- Ottaviani, F., Disegna L. & Spolaor D. (1988). Yeasts and identification in food industry. *Microbiologie- Aliments- Nutrition*. 6: 221-226.
- Ozbay, N. et Newman., S.E. (2004). The effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedlings. *Acta Horticulture*. 63(5):131-135.
- Raper, K.B. & Fennell. (1965). The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* 5: 163-176.
- Roco, A. & Péres. L.M. (2001). In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria* in the presence of growth regulators. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 04 :68-73.
- Saran Sundar, M., T. Vinodhkumar. & Ramanathan, G. (2013). Evaluation of Antifungal Activity Of Metabolites From *Trichoderma* Species Against Fungal Phytopathogens. *International Journal of Science Innovations And Discoveries*. 3 (5), 528-538.
- Schirmbock, M., Lorito, M., wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atlac, I., Scala, F., Harman, G. E. & Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against *phytopathogenic* fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 4364- 4370.
- Toffa, D.D. (2015). Étude de la contamination de certains aliments d'origine végétale de la République du Niger les moisissures toxinogènes. Thèse de Doctorat d'état. Université Mohammed V, Morocco.252 p.
- Wang, X., Yu, J., Wang, Y., & Wang, L. (2002). Mechanism-based quantitative structure–activity relationships for the inhibition of substituted phenols on germination rate of *Cucumis sativus*. *Chemosphere*. 46 (2), 241-250.
- Weiser, H.H., Mountney G.J. & Gould, W.A. (1971). Practical food microbiology and technology. The avie Publishing Company, Inc. England. P. 25-125.

- Wells, H. D., Bell, D. K. & Jaworski, C. A. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62 : 442-447.
- Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061-1070.
- Zhihe, C. , Qingping, W. & Mlfflong, X. (1998). Advance of bio control of *Trichoderma* and *gliocladium*. *J. microbiol*, 25(5); 284-286.

Annexes

Annexe n° 1

Composition des milieux de cultures

Les milieux de culture

Les milieux de culture ont été autoclavés à 120 °C pendant 20 minutes sous une pression de 1 bar.

Milieu PDA pH 6,5 (Bouhot et Billotte, 1964).

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

Milieu Agar 2 % (Downes et Ito, 2001).

Eau Distillée	1000 ml
Agar agar	20 g

Annexe n° 2

Souches obtenues par isolement et purification

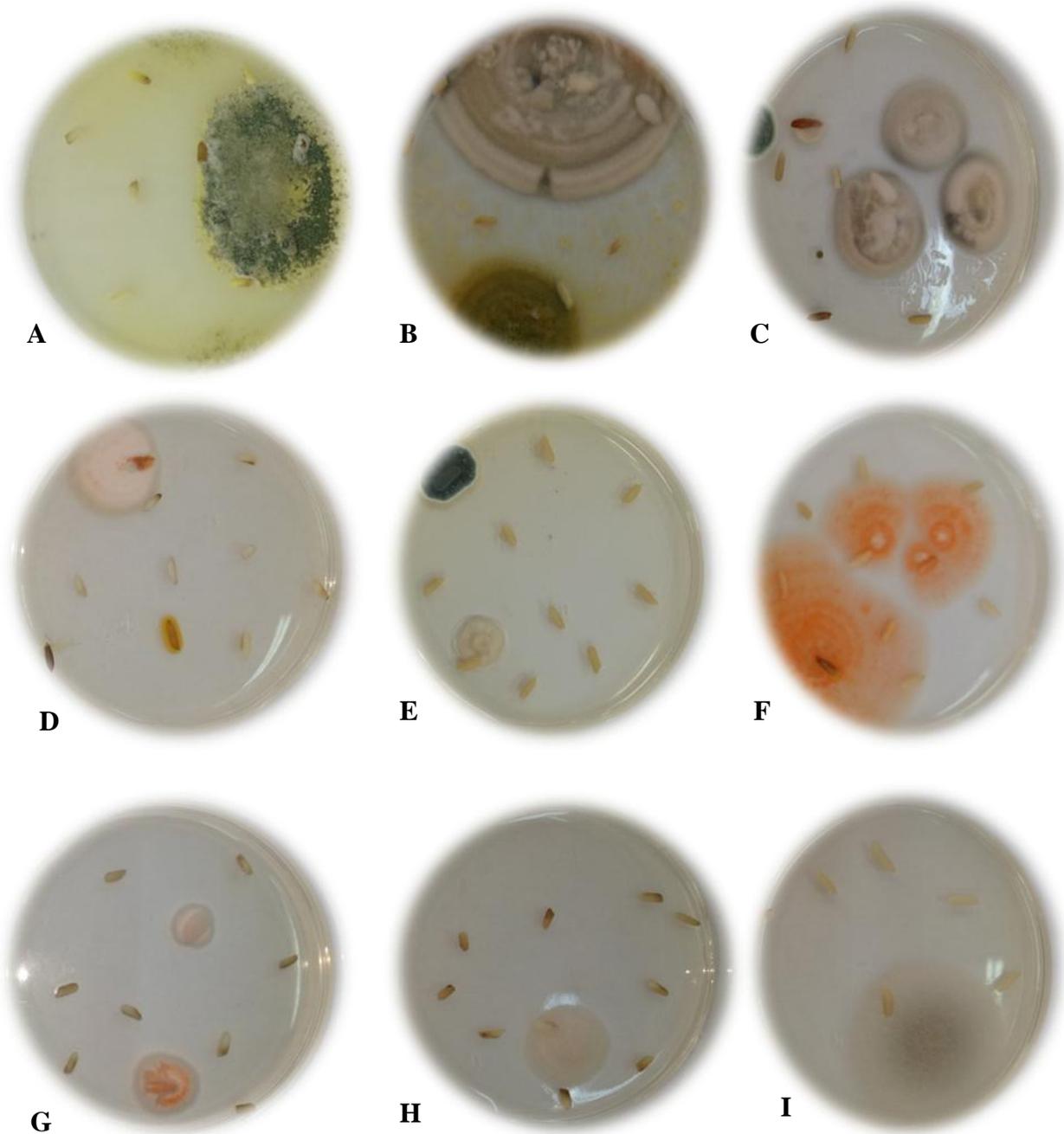


Figure n° 12 : Isolement des champignons à partir des grains de riz de chaque commune.

A : DAM1, **B :** FR1, **C :** HMD1, **D :** HMD2, **E :** KRM 2, **F :** MS2, **G :** SR1, **H :** SR2, **I :** TR1



Figure n°13 : Observation macroscopique de la souche *T. harzianium*

A : Face, **B:** L'envers.

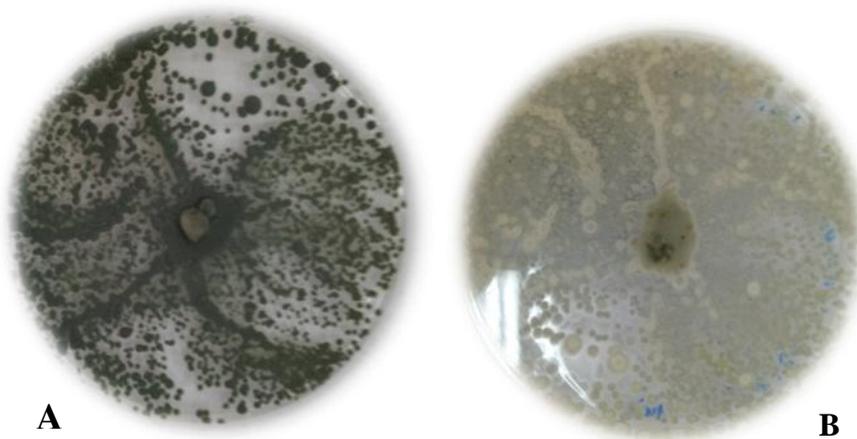


Figure n° 14 : Observation macroscopique de la souche *A. niger*.

A : Face, **B :** L'envers.

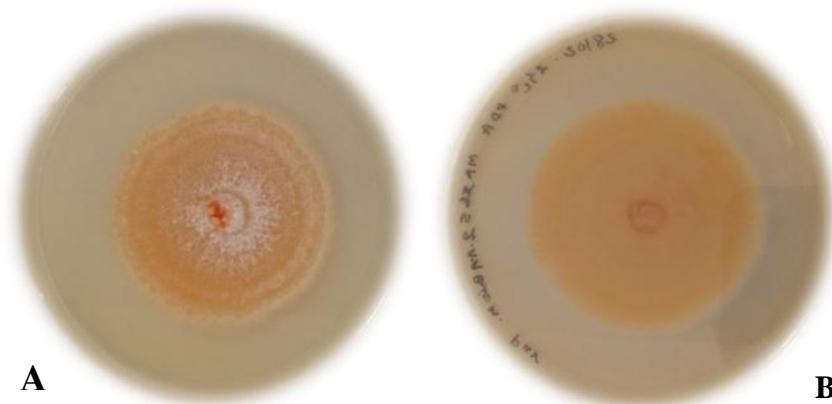


Figure n° 15: Observation macroscopique de la souche *Fusarium*

A: Face, **B:** L'envers.



Figure n° 16: Observation macroscopique de la souche *Rhizopus*

A: Face, **B:** L'envers.

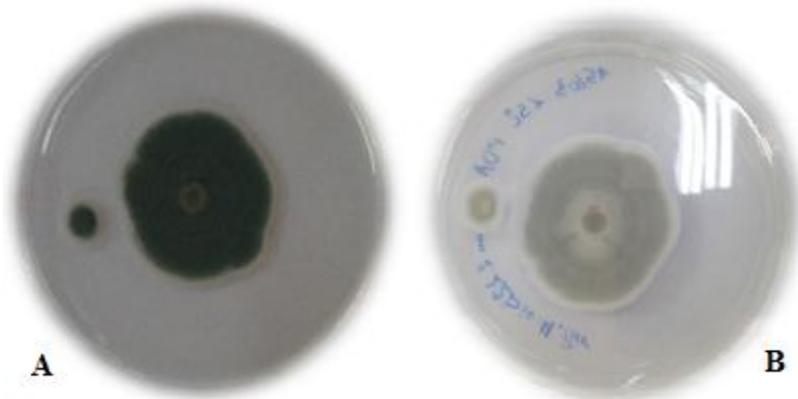


Figure n° 17: Observation macroscopique de la souche de *Penicilium*

A: Face, **B:** L'envers.

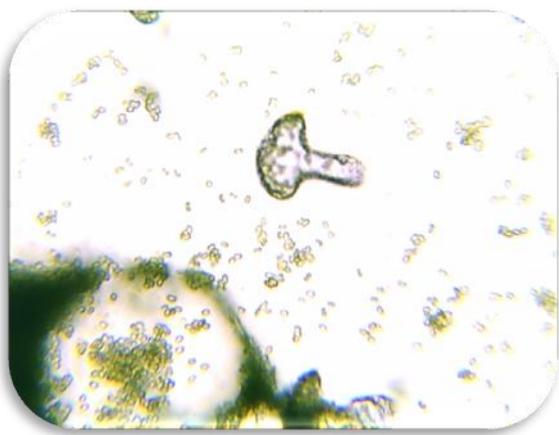


Figure n°18 : Observation microscopique de la souche *T. harziaium* (x40).

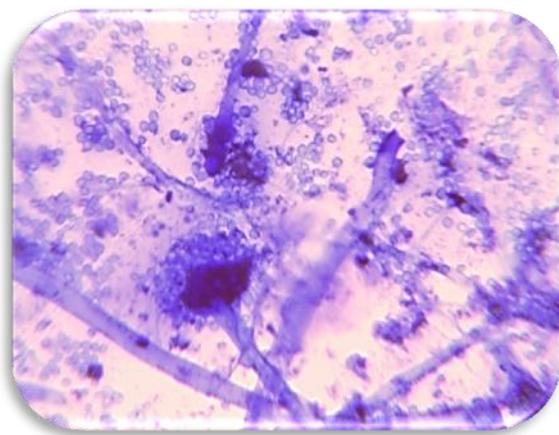


Figure n° 19 : Observation microscopique de la souche *A. flavus* (x40).

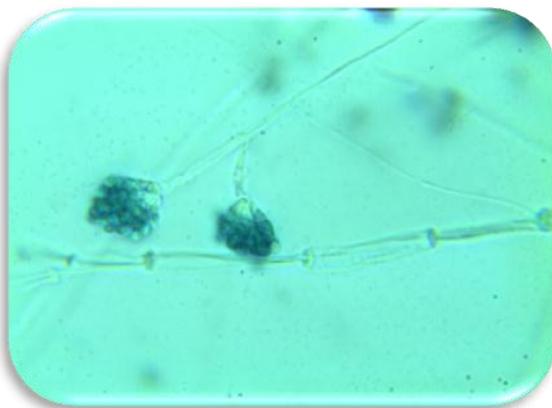


Figure n°20 : Observation microscopique de la souche *Penicillium* (x40).

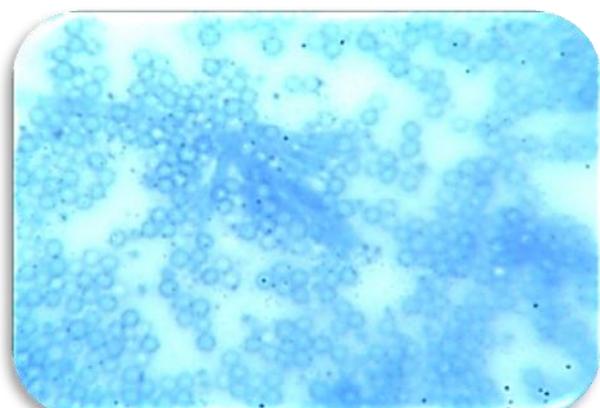


Figure n° 21 : Observation microscopique de la souche *A. nger* (x40).

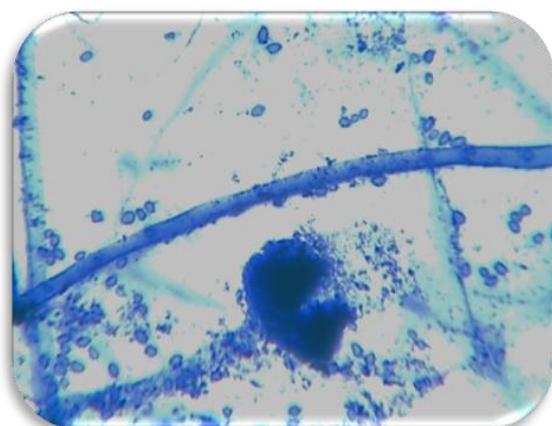


Figure n°22 : Observation microscopique de la souche *Rhizopus* (x40).

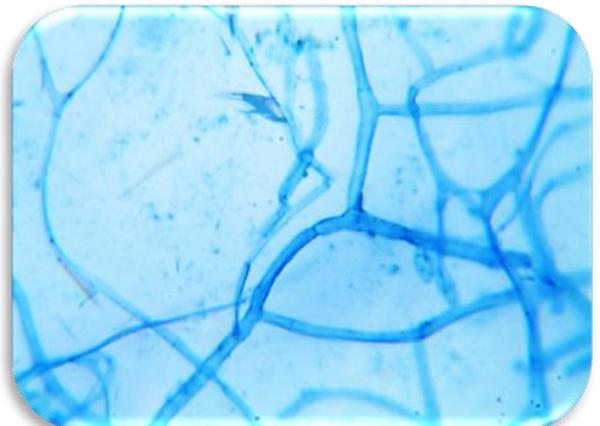


Figure n°23 : Observation microscopique de la souche *Fusarium* (x40).

Annexe n° 3

Tableau n°06 : Diamètres moyens des souches témoins (cm)

code	1 er jour		moyen	2émè jour		moyen	3 émè jour		moyen	4 émè jour		moyen
	FM1	0,7	0,7	0,7	1,5	1,5	1,5	2	2	2	2,7	2,5
PM1	0,8	0,8	0,8	1,2	1	1,1	1,7	1,5	1,6	2	1,7	1,85
FM2	1	1	1	2,2	2	2,1	3,5	3	3,25	4,1	3,5	3,8
PM2	0,7	0,8	0,75	1,2	1,3	1,25	2	2	2	2	2	2
AF	1,9	1,9	1,9	2,8	2,5	2,65	2,8	2,7	2,75	2,9	2,8	2,85
PM3	0,8	0,8	0,8	1,4	1,3	1,35	1,6	2	1,8	2,2	2	2,1
AN	1	0,7	0,85	1,7	1,3	1,5	2,1	1,7	1,9	2,5	2,2	2,35

Tableau n°07 : Diamètres moyens des souches en confrontation directe (cm)

code	1er jour		moyen	2émè jour		moyen	3 émè jour		moyen	4 émè jour		moyen
	FM1	0,7	0,7	0,7	0,9	1,65	1,275	0,9	1,65	1,275	0,9	1,65
PM1	1	1	1	2	1,2	1,6	2	1,2	1,6	2	1,2	1,6
FM2	0,75	0,75	0,75	1,5	0,9	1,2	1,5	0,9	1,2	1,5	0,9	1,2
PM2	0,8	0,8	0,8	0,9	1	0,95	0,9	1	0,95	0,9	1	0,95
AF	1,75	1,75	1,75	1,9	2	1,95	1,9	2	1,95	1,9	2	1,95
PM3	0,8	0,8	0,8	1	0,8	0,9	1	0,8	0,9	1	0,8	0,9
AN	0,75	0,75	0,75	0,7	0,8	0,75	0,7	0,8	0,75	0,7	0,8	0,75

Tableau n°08 : Diamètres moyens des souches en confrontation indirect (cm)

code	1er jour		moyen	2émè jour		moyen	3 émè jour		moyen	4 émè jour		moyen
	FM1	1	0,9	0,95	1,4	1,35	1,375	2,05	3,2	2,625	2,9	2,95
PM1	0,65	0,65	0,65	0,95	1,07	1,01	1,45	1,55	1,5	1,65	1,95	1,95
FM2	0,8	0,7	0,75	1,5	1,35	1,425	1,5	1,95	1,725	1,9	1,95	1,95
PM2	0,95	0,95	0,95	1,1	1,4	1,25	1,8	1,75	1,775	1,55	1,6	1,6
AF	0,85	1,55	1,2	1,6	1,8	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	2,2	2,2
PM3	0,95	0,95	0,95	1,1	1,05	1,075	1,6	1,2	1,4	1,85	1,25	1,25
AN	0,85	0,7	0,775	1	1,1	1,05	1,5	1,1	1,3	1,5	1,1	1,1

Tableau n°09 : Pourcentages d'inhibition obtenus par confrontation directe (%)

Code	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour
FM1	42,85	18,33	13,75	10,57
PM1	0	54,54	37,5	32,34
FM2	25	9,52	6,15	5,26
PM2	26,66	4	2,5	2,5
AF	39,47	35,84	34,54	33,33
PM3	25	7,4	5,55	4,76
AN	29,41	16,666	13,15	10,63

Tableau n°10 : Taux d'inhibition obtenus par confrontation indirecte (%)

Code	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour
FM1	35,71	10	8,6	0,69
PM1	12,5	9,09	6,25	2,7
FM2	25	36,9	46,96	49,34
PM2	26,66	12	10	5
AF	36,84	36,79	34,54	29,82
PM3	12,5	18,51	20,83	26,19
AN	8,82	30	31,57	44,68

Tableau n°11 : Analyse de variance de la confrontation directe en fonction des souches

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2647,11122	6	441,185204	2,73578649	0,04004776	2,57271164
A l'intérieur des groupes	3386,55422	21	161,264487			
Total	6033,66545	27				

Tableau n°12 : Analyse de variance de la confrontation directe en fonction de la durée du traitement

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	673,000822	3	224,333607	1,0043543	0,40794785	3,00878657
A l'intérieur des groupes	5360,66463	24	223,361026			
Total	6033,66545	27				

Tableau n°13 : Analyse de variance de la confrontation indirecte en fonction des souches

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	3451,70684	6	575,284474	5,5815604	0,00135796	2,57271164
A l'intérieur des groupes	2164,44383	21	103,068754			
Total	5616,15067	27				

Tableau n°14 : Analyse de variance de la confrontation indirecte en fonction de la durée du traitement

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2,83483929	3	0,94494643	0,00404016	0,99963564	3,00878657
A l'intérieur des groupes	5613,31583	24	233,88816			
Total	5616,15067	27				

Abstract

Rice grains are considered as an excellent substrate for fungal development, and an important factor for mycotoxin secretion and deterioration. In this context, the objective of this study is to identify these mycotoxinogenic fungi, present in rice marketed in Tiaret, and to evaluate the antagonistic effect of the *T. harzianum* on these pathogenic fungi.

However, the identification of the pathogenic flora based on the analysis of macroscopic and microscopic morphology revealed the presence of six (6) strains appertaining to five (5) different genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Rhizopus*.

Among these isolated fungi, the strain *T. harzianum* was selected as an antagonist agent. The direct and indirect confrontation tests, on culture medium, between the pathogens and the antagonist agent revealed that, *T. harzianum* could invade the colonies of the pathogens tested and which showed a significant inhibitory effect.

Key words: *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma harzianum*, *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp, antagonistic activity, mycotoxins.Rice

Résumé

Les grains de riz forment un excellent substrat pour les moisissures, où la flore fongique de stockage constitue un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude consiste à identifier ces champignons mycotoxinogènes présents dans le riz commercialisé dans la région de Tiaret et l'évaluation de l'effet antagoniste de l'agent antagoniste *T. harzianum* vis-à-vis ces champignons pathogènes.

Cependant, l'identification de la flore pathogène basée sur l'analyse des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques a révélé la présence de six (6) souches représentant 5 genres différents: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Rhizopus*.

Parmi ces moisissures isolées la souche de *T. harzianum* été sélectionnée comme un agent antagoniste. Les essais de confrontation directe et indirecte, sur milieu de culture, entre les agents pathogènes et l'agent antagoniste, ont révélé, que ce dernier a pu envahir les colonies des pathogènes testés et qui a montré un effet inhibiteur significative.

Mots clés : *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, antagonisme, mycotoxines.rize

ملخص

تشكل حبوب الأرز ركيزة ممتازة للفطريات التي تعتبر عاملا مهما في تدهور هذا المحصول بإفراز السموم الفطرية. في هذا السياق، فإن الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذه الفطريات السامة الموجودة في الأرز المتداول في عدة أسواق من منطقة تيارت، وتقييم تأثير الفطر المضاد *T. harzianum* على الفطريات السامة مخبرا.

تم التعرف على الفطريات المسببة للأمراض النباتية اعتمادا على الخصائص المورفولوجية، حيث أظهرت التحاليل العينية والمجهرية أظهرت وجود ست (6) سلالات متمثلة في خمسة أجناس مختلفة: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*.

من بين هذه الفطريات المعزولة، تم اختيار سلالة *T. harzianum* كمضاد بيولوجي في اختبارات المواجهة المباشرة وغير المباشرة في وسط زرع غذائي ضد الفطريات السامة، و أظهرت هذه التحاليل أن هذا المضاد البيولوجي قادر على غزو مستعمرات الفطريات السامة و تثبيط نموها بشكل هام.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.* المكافحة البيولوجية، السموم الفطرية، الأرز.