



Université Mohamed Khider Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature
Département des sciences de la nature et la vie

Référence / 2023

MÉMOIRE DE MASTER

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

BOUTABBA Sameh Raounek et DJEDDOUL Abdelbassat

Le : dimanche 25 juin 2023

Isolement des champignons filamenteux à partir des plantes et étude de leur activité antagoniste

Jury :

Mme	BOUKHAROUBA Khadidja	Pr	Mohamed Khider - Biskra	Président
Mme	DENDOUGA Wassila	MCA	Mohamed Khider - Biskra	Rapporteur
.Mme	BOULMAIZ Sara	MAA	Mohamed Khider - Biskra	Examineur

Année universitaire : 2022-2023

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédié aux personnes les plus chères au monde mes chers parents. Je ne cesserais jamais de remercier mon dieu pour m'avoir donné des parents comme vous. Que Dieu vous protège inchallah.

A mes chères frères et sœurs que j'aime et à qui je souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

A toute la famille BOUTABBA, MOKRANI.

A toutes mes amies que j'aime et à tous ceux qui me sont chers.

Raounek

Dédicaces

Je dédie mon travail à mon âme, mon grand-père décédé, qui nous a laissé un grand vide dans notre vie, que Dieu lui accorde pardon et miséricorde.

A mon père Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras et pour son enseignement continu.

A ma mère Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien.

Mes chers parents que dieu vous garde.

A mes chers frères et mes belles sœurs, pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A ma grande chère mère GHOUSBANE Roukai que dieu vous garde.

A familles :

DJEDDOUL et GHOUSBANE.

A mes Amis qui sont devenus mes frères de cœur !

DJELLOUL Med Elhadi (dadi), BAKROUNE khirddine, CHENINI Chihab Eddine, MESSOUD Dbih Nidal, MAAOUI akram, GHAZALI Alla Eddine, GHAZALI Mohamed, GOUTTAYA Ziad, GOUTTAYA Abdelhakim, GOUTTAYA Issam Eddine, GUENDOZ Med Ilyes, SAADAOUI Aberrahmane, GHOUSBAN Wail, GHIBOUB Tahar, KHARCHI Younes, HEBILEZ Mohamed, CHOUAIB Fateh, DJOUDI Oussama, REKIS Said, KEBKOUBE Omar, BRIAK Ziad

A tous Ceux et Celles que j'estime et que je n'ai pas cités ! A mes collègues Microbiologie appliquée de promotion (2023)

A tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation du primaire jusqu'au Master 2.

Enfin, à tous ceux qui m'aime.

Abdelbasset

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de mon avoir donné la patience, la santé et pour mon avoir accordé la volonté et le courage pour élaborer ce travail car sans lui rien n'est possible.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, premièrement notre promotrice Dr. DENDOUGA Wassila, qu'a accepté de nous encadrer et diriger ce travail avec la plus grande rigueur scientifique, ses encouragements, sa compréhension, son aide et sa très gentillesse durant tout le long de notre mémoire et ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques et ses orientations, sa patience et sa correction sérieuse de ce manuscrit.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres de jury ; d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à BOUKHAROUBA Khadidja et BOULMAIZ Sara Professeure et Maitre-assistant à l'université Mohamed Khider d'avoir accepté de présider le jury. Nous tenons à saisir cette occasion pour vous exprimer nos profondes gratitude tout en vous témoignant notre respect.

A tous mes enseignants.

Nous adressons notre profond remerciement aussi à l'équipe du laboratoire de la faculté des SNV Pour leurs aides et les efforts déployés pour faciliter notre travail et surtout pour leur gentillesse. Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Dédicaces	
Remerciements	
Table des matières	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Première Partie : Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Les champignons filamenteux

1.1 Généralité.....	2
1.2. Caractéristiques générales des champignons :.....	2
1.3. Mode de vie des champignons filamenteux :	2
1.4. Mode de reproduction des champignons filamenteux :.....	3
1.5. Phylogénie et classification des champignons.....	4

Chapitre 2 : Activité antagoniste

2.1. Définition de l'antagonisme	5
2.2. Modes d'action	5
2.2.1. Production de substances inhibitrices ou toxiques.....	5
2.2.2. Substances à structure chimique simple	6
2.2.3. Antibiotiques.....	6
2.2.4. Enzymes lytiques	6
2.2.5. Le parasitisme	7
2.2.6. L'interférence hyphale :.....	8
2.2.7. Mycostase ou fongistase :	8
2.2.8. Compétition nutritive et spatiale :.....	9
2.2.9. La prémunition :.....	9
2.3. La Lutte biologique	10
2.3.1. Historique de la lutte biologique :.....	10
2.3.2. Définition de la lutte biologique :	11

2.3.3. Intérêt de la lutte biologique	12
---	----

Deuxième Partie : Partie Expérimentale

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Matériel :.....	13
3.1.1. Matériel et outillages.....	13
3.1.2. Solutions et les réactifs :	13
3.1.3. Produits chimiques :.....	14
3.1.4. Milieux de culture :	14
3.1.5. Présentation de la zone d'échantillonnage	14
3.2. Méthodes	16
3.2.1. Echantillons utilisés dans ce travail expérimental	16
3.2.2. L'étiquetage	17
3.2.3. Milieux de culture :	18
3.2.4. Isolement des champignons	18
3.2.5. Purification et conservation des isolats fongiques	19
3.2.6. Identification des isolats fongiques.....	19
3.2.7. Le test d'activité antagoniste.....	20

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1. Résultats d'isolement et d'indentification des champignons	22
4.2. Résultats d'isolement et identification des champignons fongiques :.....	23
4.3. Tests de l'activité antagoniste.....	25
4.3.1. Test par confrontation directe	25
4.3.2. Test par confrontation indirecte	29
Conclusion.....	33
Références bibliographiques	34
Annexes.....	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1. Matériel et outils utilisés	13
Tableau 2. Etiquetage des échantillonnages.....	17
Tableau 3. Résultats d'isolement des champignons filamenteux à partir différents organes des plantes sur PDA incubées a 28 °C.....	22
Tableau 4. Isolement et identification des champignons fongiques.....	23

Liste des figures

Figure 1. L'ITDAS Biskra	14
Figure 2. Zone d'échantillonnage (photo originale)	15
Figure 3. Sources des échantillons, les plantes infectées par des champignons pathogènes ..	16
Figure 4. Photos originaux des échantillons après l'étiquetage et la conservation.....	17
Figure 5. Photo originale de manipulation d'isolement des champignons a partir un organe de plante inféctée	18
Figure 6. Méthode d'isolement des champignons à partir des fragments des plantes	19
Figure 7 Schéma présentant la confrontation directe (Dendouga,2017).	20
Figure 8. Photos originales présentant la manipulation du test la confrontation indirecte	21
Figure 9. Test de confrontation directe <i>Alternaria</i> sp. / <i>Aspergillus niger</i> sur PDA avec incubation à 28°C	26
Figure 10. Test de confrontation directe <i>Aspergillus niger</i> / <i>Geotrichum</i> sur PDA à 28°C....	26
Figure 11. Test de confrontation <i>Fusarium</i> sp. / <i>Mucor</i> sp. directe sur le milieu PDA avec incubation à 28°C°	27
Figure 12. Evolution de la croissance mycélienne d' <i>Alternaria</i> sp./ <i>Mucor</i> sp. en confrontation directe sur PDA à 28 °C.	28
Figure 13. Confrontation directe entre <i>Trichoderma</i> sp./ <i>Aspergillus flavus</i> sur PDA à 28°C.28	
Figure 14. Evolution de la croissance de <i>Trichoderma</i> sp. / <i>Fusarium</i> sp. Par confrontation directe sur PDA à 28 à °C d'incubation.....	29
Figure 15. Test de confrontation indirecte <i>Aspergillus niger</i> / <i>Geotrichum</i> sp. sur PDA à 28°C	30
Figure 16. Test de confrontation indirecte <i>Fusarium</i> sp. / <i>Mucor</i> sp. sur PDA à 28 °C	31
Figure 17. Test confrontation indirecte <i>Mucor</i> sp./ <i>Alternaria</i> sp. sur PDA à 28 °C.....	31
Figure 18. Résultat de test d'antagonisme par confrontation indirecte in vitro entre <i>fusaiium</i> sp. et <i>trichderma</i> sp.sur PDA avec incubation à28C°	32

Liste des abréviations

INRAA	Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.
ITCMI	Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles.
ITDAS	Institut technique du développement de l'agronomie saharienne.
NaOH	L'hydroxyde de sodium.
PDA	Potato Dextrose Agar.
SB	Sabouraux.
SNV	Département Science De La Nature Et De La Vie

Introduction

Introduction

Plusieurs organismes sont considérés comme des agents pathogènes des plantes, y compris les nématodes, les champignons, les bactéries ainsi que les virus. Les agents phytopathogènes, causent des pertes importantes ou des dommages aux cultures dans le monde entier, réduisant considérablement la qualité et la quantité des produits agricoles. Ces pertes représentent une menace majeure pour la production alimentaire mondiale chaque année. De plus, les infections pathogènes dans les champs ou lors du stockage après récolte peuvent affecter la santé des humains et du bétail, surtout si le pathogène produit des toxines dans ou sur les produits consommables.

Diverses méthodes, stratégies et approches sont utilisées dans la gestion des maladies des plantes. Celles-ci incluent le développement de variétés résistantes par le biais de la sélection végétale, les plantes génétiquement modifiées, l'utilisation de produits agrochimiques et de méthodes physiques ainsi que la lutte biologique (Thambugala et *al.*, 2020).

La lutte biologique est une approche de gestion des ravageurs et des organismes nuisibles qui repose sur l'utilisation d'agents biologiques, tels que des prédateurs, des parasites, ou des compétiteurs, pour réduire ou réguler les populations indésirables. Cette stratégie offre de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles de lutte, notamment en termes de durabilité, de sécurité pour l'environnement et de préservation de la biodiversité (Van Lenteren, 2012) ; la lutte biologique repose sur le concept de l'équilibre écologique et de la régulation naturelle des populations. Elle vise à promouvoir la présence d'organismes bénéfiques qui se nourrissent des ravageurs ou les infectent, limitant ainsi leur multiplication et leur impact sur les cultures (Smith, 2010). Les microorganismes jouent également un rôle crucial dans la lutte biologique, qui ont démontré leur efficacité dans le contrôle des maladies des plantes (White et *al.*, 2018). Plusieurs études menées sous serre et aux champs ont prouvé le pouvoir antagoniste des champignons filamenteux, en particulier du genre *Trichoderma*, qui ont la capacité de réduire la sévérité des symptômes d'une large gamme de maladie (Dendouga, 2017).

Pour atteindre notre objectif, la partie expérimentale est devisée en trois étapes principales :

- ✓ Isolement des champignons filamenteux à partir des plantes cultivées.
- ✓ Identification de chaque isolat macroscopiquement et microscopiquement.
- ✓ Etude de l'activité antagoniste des isolats par le test de confrontation directe et indirecte.

Première Partie
Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 :
Les champignons
filamenteux

Chapitre 1 : Les champignons filamenteux

1.1 Généralité

Les champignons filamenteux, ou champignons, sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle, ce qui en fait des hétérotrophes. Par conséquent, leur développement nécessite une source de carbone organique. Dans l'arbre de vie, ils forment un groupe à part parmi les eucaryotes (Kendrick, 2000).

Les champignons filamenteux sont des thallophytes, ces microorganismes ne contiennent pas de racines, de tiges ou de feuilles. Ils se caractérisent par des filaments libres ou entrelacés (hyphes) se forment et le filament entier est appelé mycélium. Celui-ci peut être coenocytique (non compartimenté, c'est-à-dire des hyphes issus de divisions nucléaires répétées sans division cellulaire concomitante), ou compartimenté (Villard, 1999). Classiquement, les champignons sont regroupés dans un Règne distinct, à savoir la mycologie ou le cinquième règne (Kendrick, 2000).

1.2. Caractéristiques générales des champignons :

- Les champignons sont des organismes eucaryotes.
- Ils ont la capacité de se reproduire de manière sexuée et/ou asexuée (Dufresne, 2018).
- Leur reproduction est principalement assurée par des spores unicellulaires ou pluricellulaires (Bouchet et *al.*, 1999).
- Tous les champignons sont dépourvus de chlorophylle, ce qui les oblige à dépendre entièrement de sources externes pour leur apport en carbone. Ils sont donc classés parmi les consommateurs, à l'instar des animaux (Bouchet et *al.*, 2005).
- Ils appartiennent au groupe des Thallophytes. Leur caractéristique distinctive réside dans la formation de filaments appelés hyphes, qui peuvent être libres ou entrelacés, et l'ensemble de ces filaments est désigné sous le nom de mycélium (Bouchet et *al.*, 1999 ; Boiron, 2005).

1.3. Mode de vie des champignons filamenteux :

Les champignons sont des organismes hétérotrophes. C'est-à-dire qu'ils ont pour fonction de décomposer la matière organique morte ou en décomposition pour extraire les éléments minéraux essentiels. Ils exercent une fonction cruciale dans le processus de recyclage

des matières mortes, telles que les débris végétaux et animaux. Le règne fongique se compose de trois principaux types trophiques, à savoir :

- ✓ **Saprophytisme** : Les champignons saprophytes sont des organismes qui se nourrissent de la matière organique et jouent un rôle important dans son recyclage (Lutzoni et *al.*, 2004). Ils sont souvent appelés décomposeurs de polymères présents dans les parois végétales (comme le bois) et peuvent être classés dans deux phylums différents. Le premier phylum, les Basidiomycètes, regroupe les champignons responsables de la pourriture brune et blanche (Thuillier, 2013). Le second phylum, les Ascomycètes, se compose principalement des champignons responsables de la pourriture molle appelés "soft-rot fungi" (Hatakka et Hammel, 2011).
- ✓ **Symbiose** : implique une interaction étroite entre les champignons symbiotiques et les racines des plantes, qui se traduit par le développement de structures arbusculaires (Duponnois et *al.*, 2013). Lors de ces échanges, les deux partenaires vont transférer des éléments nutritifs et des minéraux. Environ 95% des plantes vasculaires sont associées à une symbiose mycorhizienne (Crozet et Canard, 2016).
- ✓ **Parasitisme** : est une association entre deux espèces où la survie de l'une dépend de l'autre pour satisfaire ses besoins vitaux fondamentaux, et cela est gouverné par différents mécanismes moléculaires régissant ces interactions (Lo Presti et *al.*, 2015, Nigg et Bernier, 2017). Les parasites peuvent être obligatoires, facultatifs ou opportunistes selon les cas (Lutzoni et *al.*, 2004).

1.4. Mode de reproduction des champignons filamenteux :

Les champignons filamenteux ont un mode de développement particulier, à savoir la croissance d'un mycélium végétatif qui peut produire des spores sexuées ou asexuées (conidies) en fonction de l'espèce et des conditions environnementales pour leur reproduction. Le cycle de vie de ces champignons commence et se termine par les spores, qui constituent l'état dormant du microorganisme et permettent ainsi la dispersion et la survie de l'espèce (Drougard, 2018)

- ✓ **La reproduction sexuée** : sous sa forme téléomorphe, implique la fusion de deux gamètes haploïdes (n), donnant naissance à un zygote diploïde ($2n$).

Les spores issues de la reproduction sexuelle sont soit le résultat d'une fécondation (zygospores et oospores), soit le résultat d'une méiose, c'est le cas des ascospores ou basidiospores (Carlile et Watkinson, 1994).

- ✓ **La reproduction asexuée** : chez les champignons est principalement assurée par la production de spores, soit à partir de sporanges, soit à partir de cellules conidiogènes

présentes dans les hyphes. Il s'agit des spores formées par mitose, qui est le mode le plus fréquent (Raven et *al.*, 2000).

1.5. Phylogénie et classification des champignons

La classification des champignons repose sur la combinaison des caractères morphologiques, phylogénétiques et la présence ou l'absence d'une reproduction sexuée (Guarro et *al.*, 1999 ; Redecker, 2002).

Le règne fongique est divisé en quatre phylums distincts, déterminés par la présence ou l'absence de cloisons dans le thalle, la présence ou l'absence de gamètes ou de spores mobiles, ainsi que les caractéristiques morphologiques des organes spécialisés dans la reproduction sexuée (Sylvie, 2015). Il existe donc quatre classes de champignons identifiées

- ✓ **Zygomycètes** : Ils comprennent environ 200 espèces, collectant des champignons saprophytes, ainsi que des insectes (Entomophthorales), des nématodes, des amibes (Zoopagales) et des champignons parasites des plantes. Les zygomycètes sont caractérisés par un mycélium siphonique ou symcellulaire qui se reproduit fréquemment de manière asexuée (Bouchet et *al.*, 2005). Le nom de ce groupe est dérivé d'une caractéristique du stade périodique de développement ; il s'agit d'une structure appelée zygosporange (Raven et *al.*, 2007).
- ✓ **Ascomycètes** : Appelé aussi champignon en forme de sac, dont les hyphes sont segmentés et grégaires, de sorte que les Ascomycota se distinguent par l'asque ; structures en forme de sac dans lesquelles se forment des spores méiotiques (sexuelles), également appelées ascospores (Raven et *al.*, 2003).
- ✓ **Basidiomycètes** : Ce sont des champignons en forme de bâtonnet, ou encore champignons en forme de chapeau, caractérisés par des hyphes segmentés et la formation de basidiocarpes impliqués dans la reproduction sexuée (Prescott et *al.*, 2003).
- ✓ **Deutéromycètes** : Appelés souvent champignons incomplets. Ce sont des ascomycètes ou des basidiomycètes qui ont perdu la partie sexuelle de leur cycle de vie (Perry et *al.*, 2004).

Chapitre 2 :

Activité antagoniste

Chapitre 2 : Activité antagoniste

2.1. Définition de l'antagonisme

L'antagonisme est défini comme un phénomène dans lequel un organisme inhibe le développement ou interfère avec l'activité d'un autre organisme en créant des conditions défavorables dans le milieu de culture ou en produisant des substances antimicrobiennes. L'antagonisme est l'action antagoniste entre deux systèmes, deux substances, deux fonctions de deux organismes, créant une situation néfaste pour l'un ou l'autre. L'antagonisme stimule la sporulation et provoque le développement des hyphes en termes de forme, de taille et de structure, d'orientation du développement, l'arrêt complet du développement et le raccourcissement des fragments d'hyphes ou parfois même la lyse du mycélium fongique (Weller, 1988).

2.2. Modes d'action

Les principaux modes d'action de l'antagonisme microbien sont :

2.2.1. Production de substances inhibitrices ou toxiques

Une forme très courante d'antagonisme est due à des espèces microbiennes produisant des substances toxiques pour les espèces voisines. Ces substances peuvent n'avoir aucune spécificité : elles agissent sur un très grand nombre d'espèces microbiennes. Cependant, ils peuvent s'avérer toxiques uniquement pour certains groupes ou pour certaines espèces sensibles. Elles sont donc considérées comme spécifiques

L'effet de ces substances est très variable. On distingue en général :

- ✓ Un effet bactériostatique ou myostatique (fongistatique), se traduisant par un arrêt de la croissance de la bactérie ou du champignon.
- ✓ Un effet bactéricide ou fongicide, se traduisant par la mort définitive de la bactérie ou du champignon.
- ✓ Un effet bactériolytique ou mycolytique, se traduisant par la lyse des cellules bactériennes ou fongiques.

Les substances inhibitrices ou toxiques ont une structure chimique simple comme par exemple les acides minéraux, les enzymes lytiques (Dommergues et Mangenot, 1970).

2.2.2. Substances à structure chimique simple

L'activité de certains micro-organismes peut se traduire par l'accumulation dans le sol de diverses substances minérales tels que l'ammoniac, les nitrites, l'hydrogène sulfuré ou organiques tels que les alcools ou les acides organiques). Or, à partir de doses plus ou moins élevées, ces différentes substances se révèlent toxiques pour de nombreux autres micro-organismes. On se trouve donc en présence d'un processus d'antagonisme à caractère non ou peu spécifique (Dommergues et Mangenot, 1970).

2.2.3. Antibiotiques

La microflore tellurique renferme une très forte proportion de microorganismes capables de synthétiser des substances antibiotiques vis-à-vis de micro-organismes très divers. Les actinomycètes se classent parmi les microorganismes les plus actifs en ce qui concerne la production d'antibiotiques. Cette propriété est très répandue chez le genre *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora*.

Parmi les bactéries, plusieurs espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* peuvent produire une grande gamme. Les espèces fongiques connues par leur production des substances antimicrobiennes appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* et *Sclerotinia*.

Les antibiotiques agissent, en générale, en inhibant l'activité ou la synthèse d'un constituant cellulaire essentiel. Certains antibiotiques perturbent la biosynthèse d'ADN, ou celle du mucocomplexe des parois cellulaires, d'où la lyse osmotique des microorganismes sensibles lorsqu'ils se trouvent en milieu hypotonique. D'autres antibiotiques agissent en désorganisant la membrane des cellules à la manière d'un détergent (Dommergues et Mangenot, 1970).

2.2.4. Enzymes lytiques

Divers micro-organismes exercent leurs propriétés antagonistes par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaire qui lysent les parois cellulaires des microorganismes sensibles. En les utilisant comme source de carbone et d'énergie. Ce phénomène propre aux bactéries et aux champignons, peut affecter tous les groupes de organismes du sol. Les parois des organismes-sensibles sont digérées par des enzymes extracellulaires à savoir ; les chitinases, les glucanases, les cellulases et les protéases.

Parfois accompagnés de toxines destinées à immobiliser ou à détruire les proies. Le contenu des cellules diffuse dans le milieu, ou d'autres enzymes notamment des protéases,

assurent sa dégradation. Les produits de digestion sont absorbés par le microorganisme responsable de la lyse (Dommergues et Mangenot, 1970). Parmi ces organismes on trouve les eubactéries, les actinomycètes mycolytiques, (Katznelson et *al.*, 1964).

2.2.5. Le parasitisme

Le parasitisme constitue le mode d'antagonisme qui consiste à l'attaque directe d'un micro-organisme par un autre dans un but nutritionnel. Quelques champignons peuvent être parasités par d'autres champignons, cette forme de parasitisme a reçu le nom de mycoparasitisme (Dommergues et Mangenot, 1970).

Les mycoparasites ont été répartis selon Park et al. (1956), en fonction de leur activité c'est-à-dire en rapport à ce qu'ils exigent comme substrat en :

Mycoparasites biotrophes et mycoparasites nécrotrophes ; les premiers, dépendent étroitement de l'activité de leur hôte entreprenant des relations équilibrées, vu qu'ils sont capables de vivre sur la matière organique morte. Les seconds sont des destructeurs et des saprophytes qui parasitent dans la nature d'autres champignons (Park et al., 1956), on distingue deux groupes de mycoparasites selon Boosalis et Mankau (1965) suivant leurs effets sur l'hôte:

- ✓ Les mycoparasites destructeurs dont l'attaque aboutit à la mort de l'hôte ;
- ✓ Les mycoparasites dont l'attaque provoque seulement des dommages peu importants ou insignifiants.

Les *Bdellovibrio* sont de très petites bactéries qui représentent une bonne illustration du concept de parasitisme. Découverts il y a une trentaine d'années seulement, les *Bdellovibrio* pénètrent dans les parois de d'autres bactéries telles que *Pseudomonas* ou *Xanthomonas*, où elles pénètrent dans leur cytoplasme et s'y multiplient aux dépens de l'hôte (Davet, 1996). Il existe de nombreux autres champignons parasites (mycoparasites) des champignons du sol. La plupart d'entre eux sont des parasites facultatifs capables de mener une vie saprophyte active (*Rhizopus*, *Solani*) peut se développer dans les mycéliums relativement gros de certains zygomycètes. Il peut lui-même être parasité par divers autres champignons tels que *Trichoderma harzianum*, (Davet, 1996).

En dehors des hyphes, les mycoparasites peuvent attaquer d'autres structures : conidies, sporangiophores, oospores, chlamydospores, zoospores, sclérotites. *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Teratosperma sclerotivora*, *Coniothyrium minitans* attaquent les sclérotites qui constituent les formes de conservation de *Sclerotium cepivorum* ou des *Sclerotinia* (Davet, 1996).

2.2.6. L'interférence hyphale :

L'inhibition par contact connue sous le nom d'interférence hyphale ne semble pas mettre en œuvre des substances inhibitrices ou toxiques vis-à-vis de l'hôte (Davet, 1996). Ce phénomène s'observe chez certains champignons capables de conquérir des substrats déjà colonisés par d'autres espèces. Lorsque les apex des hyphes des champignons dominés arrivent au contact du mycélium du champignon envahisseur, leur croissance s'arrête brusquement ; au bout de quelques minutes, leur cytoplasme devient granuleux et l'on observe une augmentation de la perméabilité membranaire et une dégénérescence des mitochondries.

Ce mécanisme est mis en évidence chez les Basidiomycètes corpophiles et lignivores (Ikediugwuet Webster, 1970) et aussi chez un oomycète comme *Pythium oligandrum* (Lutchmeah et Cooke, 1984).

2.2.7. Mycostase ou fongistase :

C'est l'inhibition de la germination des spores fongiques même si les conditions de l'environnement, en particulier la température et l'humidité, semblent favorables à la germination. Ce phénomène d'inhibition qui intéresse non seulement les spores au moment de la germination, mais les hyphes en cours de croissance, a reçu le nom de mycostase ou fongistase (Dommergues et Manganot, 1970).

Les champignons dont les spores sensibles à la mycostase sont : *Fusarium culmorum*, *Phomabetae*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium notatum*, et *Stachybotrisatra* (Payen, 1962 ; Griffiths, 1966). La mycostase est susceptible d'être atténuée ou même supprimée par apport au sol de substances nutritives (résidus végétaux, exsudats racinaires, mélasses, monosaccharides, disaccharides, acide citrique, acide ascorbique...) (Lokwood, 1964 ; Payen, 1962 ; Dobbs et *al.*, 1960).

Inversement, elle peut être renforcée par incorporation au sol de certaines substances organiques (paille d'avoine) (Powelson et Patil, 1963).

Selon Dommergues et Manganot (1970), la nature biologique de la mycostase semble bien due à l'activité microbienne pour les raisons suivantes :

- ✓ La mycostase est supprimée par la stérilisation, la chaleur, les antiseptiques et la dessiccation (Dobbs et *al.*, 1960). Dans le cas de stérilisation partielle, elle réapparaît rapidement avec la recolonisation du sol par les micro-organismes ;
- ✓ La mycostase peut être réinstallée par inoculation avec un peu de sol non stérile ou avec des micro-organismes ;

- ✓ La mycostase est d'autant plus développée que l'activité microbienne du sol est intense. Elle diminue lorsque cette activité faiblit, en particulier dans les horizons profonds ou dans les sols où l'acidité restreint la densité des micro-organismes.
- ✓ Pour expliquer l'origine de la mycostase, on fait actuellement appel à l'une ou l'autre des hypothèses suivantes :
- ✓ Hypothèse de l'origine compétitive : la mycostase serait due à la déficience du sol en substrats nécessaires à la germination des spores fongique d'où apparition d'une compétition très vive entre les spores du micro-organisme sensible, d'une part et les autres micro-organismes telluriques d'autres part.
- ✓ Hypothèse de l'induction par des substance inhibitrices mycostatique en particuliers, des antibiotiques (Dommergues et Mangenot, 1970).

2.2.8. Compétition nutritive et spatiale :

Lors de la décomposition de la matière organique, le nombre et l'activité des micro-organismes augmentent, créant ainsi une énorme demande d'oxygène, de nutriments et d'espace, entraînant une compétition pour les nutriments et l'espace.

Ainsi, la compétition est décrite lorsque des micro-organismes sont situés sur un même substrat et que le nombre de facteurs nécessaires à leur développement, dont l'espace et l'oxygène, est limité, et qu'un ou plusieurs micro-organismes parviennent à être plus performants et plus efficaces que les autres. Les micro-organismes à faible viabilité saprotrophe ne peuvent pas rivaliser avec ceux à forte viabilité saprotrophe ; par conséquent, ils meurent ou forment des structures dormantes spécialisées (Davet, 1996).

2.2.9. La prémunition :

La prémunition est une méthode de lutte biologique dans laquelle le micro-organisme inoffensif est utilisé non plus pour s'opposer directement à l'action des micro-organismes pathogènes, mais pour déclencher chez la plante des mécanismes de défense qui s'opposent au développement de l'infection par l'agent pathogène (Davet, 1996).

La protection de la plante résulte de l'activation de plusieurs mécanismes de défense, ce qui lui confère une grande étendue et une grande stabilité, sa durée est variable. Chez certaines plantes, elle peut persister pendant tout le cycle de développement et même, parfois, être transmise par greffage.

Les mécanismes sont de diverse nature : épaissement des parois végétales et production de molécules de défense telles que phyto-alexines et PR-protéines. Cette induction

de résistance peut rester localisée ou au contraire s'étendre à toute la plante, on parle alors d'induction systémique de résistance (Silvy et Riba, 2002).

2.3. La Lutte biologique

Face aux nombreux inconvénients qui découlent de l'utilisation de pesticides chimiques, d'autres alternatives ont été recherchées pour protéger les végétaux de différents agents pathogènes, l'espèce humaine comme consommateur et même les animaux. Ils sont aux prises avec le double défi de limiter efficacement les pertes agricoles dues aux maladies des plantes et de protéger l'environnement et la santé des organismes. L'une de ces alternatives qui a fait l'objet de recherches intensives est la lutte biologique (Agebessi, 2002).

2.3.1. Historique de la lutte biologique :

En 1897, Ernest Duchenne, dans sa thèse de doctorat, répéta et contrôla certaines de nos expériences et trouva qu'une certaine moisissure (*Penicillium glaucaum*) était une moisissure hautement toxique et en même temps un animal. J'ai écrit qu'il semble impossible de conclure que j'ai été vacciné. La culture de certains microorganismes faiblement pathogènes peut atténuer de manière très significative la virulence de ces cultures microbiennes. (Brun-Cotton et al., 1980).

En 1877, Pasteur et Joubert, ont constaté que des « bactéries aérobies » inhibent la croissance de *Bacillus anthracis*. La notion d'antagonisme n'a pris sa forme définitive qu'avec l'avènement des travaux d'Alexander Flemming en 1929, date capitale de l'histoire des antibiotiques. Le développement des connaissances en écologie microbienne, en particulier sur les relations antagonistes entre les micro-organismes du sol, a fait naître l'idée d'utiliser ces antagonistes pour lutter contre les maladies des plantes d'origine tellurique (Tims, 1932 ; Waksman, 1948 ; Clark, 1969).

L'étude de la distribution de la maladie des racines de pin due à *Fomesannosus* révèle que les attaques de ce champignon sont importantes des certains sols alcalins, mais rares ou atténuées dans certains sols plus acides où les racines sont colonisées par trichodermaviride, champignon dont on a démontré in-vitro le pouvoir antagoniste vis-à-vis de *Fomesannosus*. Ce pouvoir antagonistes de *Trichodrma viride* résulte à la fois de la synthèse d'antibiotiques, d'un pouvoir compétitif élevé dû à un taux de croissance très rapide, et d'une aptitude nette au mycoparasitisme (Rishbeth, 1952 ; Moreau et Schaeffer, 1959).

En 1961, Bliss constate que la fumigation d'un sol infesté par *Armellaria mellea* avec du sulfure de carbone n'aboutit à la disparition complète de ce champignons pathogène que

24 jours après fumigation. Or, cet effet coïncide avec la colonisation massive du sol par *Trichoderma viride*. Toujours dans le même contexte, Mitchell et Alexander, (1961) sont parvenus, en incorporant au sol de la chitine, à faire régresser sensiblement la population de *Fusarium solani*. L'efficacité des applications de ce composé dans la protection des végétaux contre les *Fusarium* a été vérifié par Buxton et al.

En 1965 et par Jouan et Lemaire en 1974, qui attribuent l'effet favorable de cet amendement à une stimulation d'un certain groupe de micro-organisme antagonistes, principalement les actinomycètes. Dans les verges d'agrumes en Israël, on a constaté que *Fusarium solani* est absent dans la plupart des sols où *Trichoderma viride* est abondant ; Inversement lorsque *Trichoderma viride* est absent, *Fusarium solani* s'installe facilement (Joffe, 1966).

Haas et Keel, (2003), ont constaté que les bactéries telles les *Pseudomonas* possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable. Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore et al., 2006). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines (Lemanceau, 1992).

Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses que le piétin échaudage des céréales, les pourritures des tubercules de pomme de terre, les fusarioses des racines et du collet de la tomate (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Pour ce qui est des mécanismes généraux de lutte microbiologique contre les maladies cryptogamiques des plantes d'origines tellurique, on distingue deux types principaux : L'antagonisme microbien, qui implique des interactions directes entre l'agent de lutte et l'agent pathogène et l'induction de résistance chez la plante hôte qui implique une interaction indirecte entre l'agent de lutte et l'agent pathogène via la plante.

2.3.2. Définition de la lutte biologique :

La lutte biologique se définit comme une méthode de lutte contre un ravageur, une maladie ou une plante adventice, utilisant des agents naturels antagonistes de ceux-ci, c'est-à

dire des phytophage (s'il s'agit d'une plante adventice), des parasites, des prédateurs, des agents pathogènes (bactéries, champignon...). Dans tous les cas les agents naturels utilisés sont réunis sous le nom de bio pesticide. Certain, notamment les auteurs anglo-saxons, en donnent une définition plus large en incluant toutes les substances organiques qui ont un effet protecteur sur les plantes, qu'elles soient trouvées dans, la nature ou synthétisées chimiquement (extrait végétaux, hormones, phéromones...) (Fraval et Silvy, 1999).

La destruction ou la stabilisation d'une population d'agents pathogènes par des champignons ou des bactéries du sol survient communément dans la nature

Ces dernières années, la lutte biologique a regagné en popularité, en partie à cause de l'échec de la lutte chimique. Les traitements chimiques tels que les fongicides donnent de bons résultats à court terme, mais à long terme leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement présentent un risque non négligeable. Elle demande plus de connaissances et d'observation, mais elle s'inscrit dans la durée et beaucoup plus intéressante d'un point de vue environnemental et économique (Corbaz, 1990 ; Toussaint, 1996).

2.3.3. Intérêt de la lutte biologique

Les principaux avantages de la lutte biologique sont sa sécurité, sa spécificité, son acceptabilité sociale potentielle, le non développement de résistance des ravageurs, son adaptabilité aux cultures et la valeur ajoutée potentielle des produits dérivés. En plus de leur rôle dans la restauration de la biodiversité des écosystèmes, ils jouent également un rôle important et efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes (Hamel, 2016). Il peut être utilisé comme alternative à d'autres batailles. Cela peut être l'introduction d'organismes pour contrôler les ravageurs exotiques (lutte biologique classique), l'augmentation de l'occurrence en ajoutant des ennemis naturels à l'environnement (lutte biologique par élevage), ou la protection (lutte biologique par action). Les insectes, bactéries, nématodes et champignons sont principalement utilisés (Noemie, 2010). La lutte biologique est considérée comme une alternative à l'utilisation de produits chimiques qui menacent l'environnement et les personnes. L'utilisation de multiples mécanismes d'action d'un même antagoniste et leur capacité d'adaptation à la rhizosphère rendent la lutte biologique plus durable que les produits chimiques. Plusieurs micro-organismes ont démontré leur efficacité dans la protection du blé. *Bacillus*, *Lysobacter* et *Pseudomonas* sont les pathogènes bactériens les mieux étudiés, tout comme les levures des genres *Rhodotorula*, *Sporoboromyces* et *Cryptococcus* (Hamel, 2016). Parmi les champignons antagonistes les plus couramment utilisés en lutte biologique, nous citons le genre *Trichoderma* (Benmehidi et Boukaabache, 2018)

Deuxième Partie
Partie Expérimentale

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques de département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Mohamed Khider –BISKRA durant le deuxième semestre de l'année universitaire 2022/2023. Notre travail porte sur l'isolement et l'identification des champignons filamenteux à partir des plantes ainsi que l'étude de leur activité antagoniste.

3.1. Matériel :

3.1.1. Matériel et outillages

Le matériel utilisé pour la réalisation de notre travail est cité dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1. Matériel et outils utilisés

Outils	Appareils
Becher	autoclave
Lame en verre	Bec benzène
Tubes à essai	Four pasteur
Pipette pasteur	Microscope optique
Pince	Bain marianne
Anse de platine	L'étuve
Eprouvette	Balance
Boîtes pétries	Plaque chauffante
Erlenmayer	Agitateur
Lame bistourise	Vortex

3.1.2. Solutions et les réactifs :

- ✓ L'eau distillée
- ✓ L'eau distille stérile
- ✓ L'eau oxygénée
- ✓ L'éthanol

3.1.3. Produits chimiques :

- ✓ Bleu de méthylène.
- ✓ L'huile à immersion.
- ✓ L'antibiotique la gentamicine (40 mg/ml)
- ✓ L'agar-agar
- ✓ Glucose nutritif

3.1.4. Milieux de culture :

- ✓ **PDA** (extrait de pomme de terre, pour sa composition voir annexe ?).
- ✓ **SB** *Sabouraud*.

3.1.5. Présentation de la zone d'échantillonnage

Nos échantillons ont été collectés de l'institut Technique de Développement de l'Agronomie Saharienne « ITDAS » de Biskra.



Figure 1. L'ITDAS Biskra

L'ITDAS a été créé par décret N° 86 - 117 du 06/05/86 modifié par le décret N° 87 - 55 du 24/02/1987 fixant le siège à Biskra. Il a pour principale mission la prise en charge des différents programmes de développement agricole des zones sahariennes. Cette structure a hérité des stations expérimentales qu'étaient rattachées aux instituts du nord du pays (INRAA, ITCMI).



Figure 2. Zone d'échantillonnage (photo originale)

Les échantillons utilisés durant nos travaux expérimentaux sur l'isolement des champignons et l'étude de leur activité antagoniste ont été prélevés à partir des parties des plantes avec des symptômes fongiques

Lors du prélèvement aseptique, il est de toute première importance d'empêcher toute contamination du matériel d'échantillonnage, des échantillons et de l'équipement soumis à l'échantillonnage. L'utilisation de matériel stérile ou désinfecté est nécessaire ainsi que l'application d'une méthodologie de travail qui garantit un prélèvement dans les meilleures conditions d'hygiène possible.

Les échantillons ont été prélevés en respectant toutes les mesures de prévention de contamination

Le travail a été fait avec le port des gans préservative et utilisation des outils stériles pour assurer la prévention de toute la flore microbienne vivantes pressentes dans l'échenillons. Par la suite, les échantillons sont conservés dans des sacs en plastiques stériles portant une étiquette.

3.2. Méthodes

3.2.1. Echantillons utilisés dans ce travail expérimental

	La plante cultivée	L'organe / partie de plante
Echantillon 01	Aubergine	Feuilles
	Courgette	Feuilles
	Arti choux '1'	Feuilles
	Tomate	Feuilles
	Betterave	Racines –feuilles
	Arti choux '2'	Feuilles –tiges
	Tomate	Tiges
Echantillon 02	Blé	Racines- feuilles- grains
	L'orge	Racines- feuilles- grains
Echantillon 03	Tomate	Organe



Figure 3. Sources des échantillons, les plantes infectées par des champignons pathogènes

3.2.2. L'étiquetage

Afin d'améliorer le flux de notre travaille pratique nous avons mis des étiquettes référenciées spéciales pour chaque échantillon pour éviter toute confusion entre eux et de faciliter le processus.

Les références d'étiquettes associées à chaque échantillon sont identifiées au tableau ci-dessous :

Tableau 2. Etiquetage des échantillonnages

	Echantillon	Etiquète
L'échantillon 01	Aubergine	« 1 »
	Courgette	« 2 »
	Arti chou	« 3 »
	Tomate	« 4 »
	Betterave	« 5 »
	Arti chou	« 6 »
	Tomate	« 7 »
L'échantillon 02	Blé	« B »
	L'orge	« O »
Echantillon 03	Tomate	« T »



Figure 4. Photos originales des échantillons après l'étiquetage et la conservation.

3.2.3. Milieux de culture :

Les champignons phytopathogènes peuvent être isolés à partir des racines ou bien des autres organes des plantes malades, pour leur isolement on a utilisé des milieux de culture différents, il s'agit de PDA (Potato Dextrose Agar) et le Sabouraud. Protocole de préparation des milieux de cultures dans (annexe01).

3.2.4. Isolement des champignons

La désinfection des échantillons :

L'isolement des champignons a été réalisé à partir des différentes parties des plantes atteintes. Présentant des signes d'infection fongique. Sur chaque plante, les parties présentant des symptômes sont délicatement coupées, étalées et mises dans des sacs stériles afin de les garder dans leurs formes initiales. La désinfection des échantillons a été faite en suivant trois méthodes différentes de désinfection citées ci-dessous.

- ✓ **Méthode 01** : Les différents organes ont été abondamment lavés à l'eau courante, découpés en fragments puis placés dans des béciers contenant du NaOH à 2 % pendant 2 min pour désinfecter superficiellement nos échantillons, puis lavés trois fois successives par l'eau distillée stérile et enfin séchés avec papier Wattman stérile. Ces fragments ont été déposés sur le milieu de culture PDA dans des boîtes de Pétri et incubés à une température de 25°C pendant 3 à 5 jours. (Dendouga, 2017).
- ✓ **Méthode 02** : Les fragments des plantes manipulées ont été découpés en petits fragments puis placés directement dans les boîtes de pétries pour être incubées à une température de 28 °C pendant 3 jours jusqu'à 5 jours (Bills, 1996).



Figure 5. Photo originale de manipulation d'isolement des champignons à partir un organe de plante infectée



Figure 6. Méthode d'isolement des champignons à partir des fragments des plantes

3.2.5. Purification et conservation des isolats fongiques

Les colonies fongiques obtenues subissent une purification, en réalisant des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de souches pures.

3.2.6. Identification des isolats fongiques

L'identification des isolats est faite à l'aide de clés dichotomiques et d'ouvrages d'identification, en faisant essentiellement appel aux caractères cultureux comme la forme, la couleur, la pigmentation et le diamètre, et aux caractères morphologiques microscopiques (mycelia et conidies) des moisissures isolées à l'état pure (Botton et *al.*, 1990).

➤ Identification macroscopique

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur les deux milieux de cultures spécifiques PDA, SB et incubée à 30°C pendant 7 jours. L'identification se fait à l'œil nue et elle se base essentiellement sur les caractères suivants :

- ✓ La vitesse de croissance (rapide, moyenne, lente).
- ✓ La texture des colonies.
- ✓ La couleur des colonies.
- ✓ La couleur du revers de la culture.

➤ Observation Microscopique

L'observation microscopique a été réalisée par la technique du scotch qui consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène. Il convient d'éliminer l'excès de colorant autour du scotch avec une feuille de papier absorbant. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements x40 (Chabasse et *al.*, 2002).

L'étude microscopique du mycélium est basée sur

- ✓ L'absence ou présence de cloisons.
- ✓ Couleur des filaments mycéliens.
- ✓ Mode de ramification des cloisons.
- ✓ Différenciation des thallo spores (Botton et *al.*, 1990).

3.2.7. Le test d'activité antagoniste

Deux méthodes sont effectuées pour tester l'activité antagoniste de nos isolats

Le test d'activité antagoniste par confrontation directe. Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant la gélose PDA, deux pastilles gélosées (5 mm de diamètre), l'une portant l'antagoniste et l'autre l'agent phytopathogène. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 5cm et à équidistance du centre de la boîte (Voir Fig.7) ; L'incubation est réalisée à 30°C pendant six jours (Dendouga, 2017)

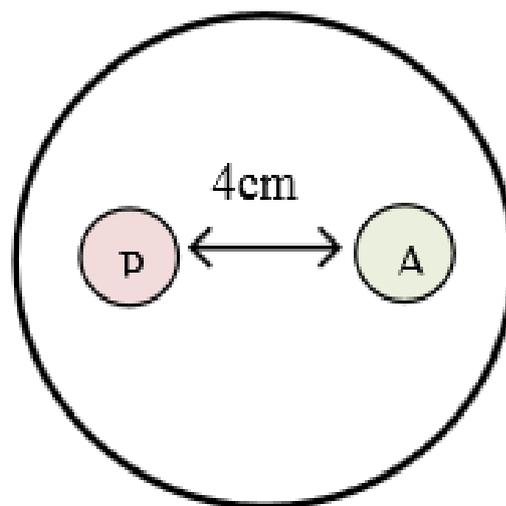


Figure 7 Schéma présentant la confrontation directe (Dendouga, 2017).

Le test d'activité antagoniste par confrontation indirecte

La méthode de confrontation indirecte, décrite par Dennis et Webster (1971), a été utilisée dans cette étude. Elle implique l'ensemencement de l'agent antagoniste et de l'agent pathogène dans deux boîtes de Pétri séparées, contenant préalablement du milieu PDA. Ensuite, les deux boîtes sont superposées, Une jonction entre les deux boîtes est réalisée à l'aide de Parafilm pour éviter toute perte de substances volatiles.

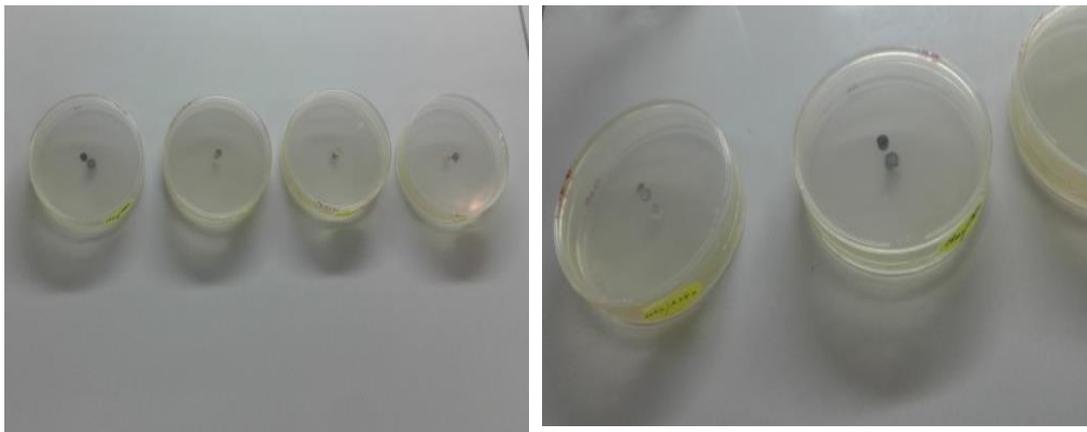


Figure 8. Photos originales présentant la manipulation du test la confrontation indirecte

Chapitre 4 :

Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1. Résultats d'isolement et d'indentification des champignons

Identifier un champignon, c'est d'abord lui reconnaître l'appartenance à un genre, qui est un groupement d'organismes liés entre eux par des caractères communs (Cahagnier, 1998). Dans notre travail, on a basé sur l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques de chaque souche fongique sur le milieu de culture PDA. L'indentification microscopique étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation...) et des spores (forme, couleur, texture de parois).

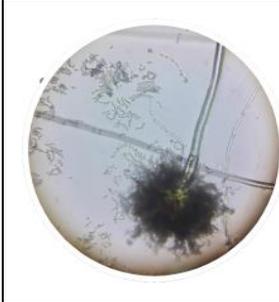
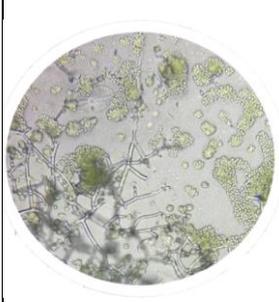
Dans notre travail, on a pu obtenir 89 isolats. Ces derniers ont servi aux tests de l'activité antagoniste directe et indirecte, après leur indentification (Tableau 3) :

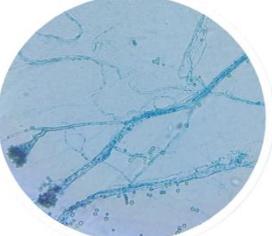
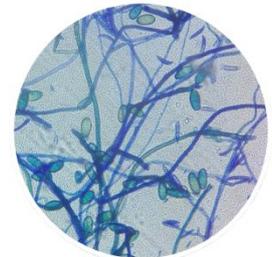
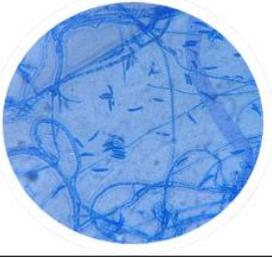
Tableau 3. Résultats d'isolement des champignons filamenteux à partir différents organes des plantes sur PDA incubées a 28 °C

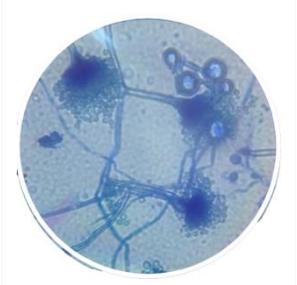
Nombre total	Nombre total	Méthode utilisée	Isolats purs	Pourcentage d'isolats purs	Isolats contaminés	Pourcentage d'isolats contaminés	Isolats purifiés	Pourcentage des isolats purs
Echantillon 01	58	M 01	22	64,70%	06	10,34%	12	18,96%
		M 02	12	35,29%	0	0	07	12,06%
Echantillon 02	17	M 01	08	47,05%	06	35,29%	09	52,94%
Echantillon 03	14	M 01	05	35,71%	0	0	09	64,28%

4.2. Résultats d'isolement et identification des champignons fongiques :

Tableau 4. Isolement et identification des champignons fongiques

	Observation macroscopique	Description macroscopique	Observation microscopique	Description microscopique	Identification de la souche
6PDA1		Croissance rapide, milieu PDA, SB, ds colonies duveteux puis granuleux avec une couleur noirâtre		Des filaments mycéliens larges septés conidiogène blastique phalidique, têt aspergillaire radiée bisérique	<i>Aspergillus niger</i>
TPDA3		Croissance rapide et extensive PDA, des colonies étalées avec un aspet laineux et zoné d'une couleur blanc à vert .		Les filaments mycéliens fines septées ,conidiogenese de type blastique phialidique .	<i>Trichoderma</i> sp.
4PDA6		Croissance rapide Des colonies duveteuses à poudreux avec une couleur verte		Structure en forme de pinceau avec des filaments mycéliens : fins, septés, à bords parallèles des conidiogenèse de type blastique phialidique.	<i>Penicillium</i> sp.
3PDA1		Croissance rapide envahissante (une semaine), des colonies duveteuses à poudreuse d'une couleur blanc puis verte		Filaments mycéliens fin septées eégulieres , tete aspergillaires radiées uni-ou bisériées .	<i>Aspergillus flavus</i>

<p>3PDA4</p>		<p>Croissance rapide, de colonies duveteuses à poudreuse, une couleur verte ou jaune, jaune orangé vert</p>		<p>Structure en forme de pinceau, mycélium fin septé à bord parallèle, conidiophore fin simple</p>	<p><i>Penicillium sp</i></p>
<p>O PDA2</p>		<p>Croissance rapide colonies avec une texture épaisse, aspect duveteux d'une couleur marron à noir.</p>		<p>Filament mycéliens septés brun conidogénèse de type balistique acropète</p>	<p><i>Alternaria sp.</i></p>
<p>3 SB1</p>		<p>Croissance rapide, des colonies poudreux ou duveteux de couleur variable blanche puis jaune à verte .</p>		<p>Filaments mycéliens fin septés, avec une tête aspergillaires radiées uni-ou bisériées .</p>	<p><i>Aspergillus sp. flavus</i></p>
<p>TSB2</p>		<p>Croissance lente, des colonies glabres avec un aspect crémeux à poudreux</p>		<p>Conidogènes de type thallicque arthrique ,longs filaments mycéliens arthrosporées avec fragmentation progressive et rétrograde des filaments</p>	<p><i>Géotrichum sp.</i></p>
<p>2PDA4</p>		<p>Croissance rapide, des colonies duveteuses à cotonneux ou floconneux, d'une couleur blanc à crème.</p>		<p>Filaments mycéliens fins, septés, hyalins, les conidogénèse de type blastique phialidique.</p>	<p><i>Fusarium sp.</i></p>
<p>2SB2</p>		<p>Croissance rapide milieu favorable SB, des colonies vert foncé avec un aspect poudreux</p>		<p>Filaments mycéliens fins septés ,conidogénèse de type blastique phialidique avec une tête aspergillaire</p>	<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>

2PDA2		Croissance rapide Envahissante avec développement aérien important, des colonie laineux avec une couleur brune		Filaments mycéliens larges, irréguliers, non septés, ramifications à angle droit, Columelle ovoïde sans apophyse, avec des spores rondes	<i>Mucor</i> sp.
6SB3		Croissance rapide, Colonies planes avec un Aspect velouté D'une couleur verte cresson à marron.		Filaments mycéliens fins, septés, réguliers ; conidiogenèse de type blastique phialidique avec petites têtes aspergillaires bisériées en colonnes évasées	<i>Aspergillus</i> sp.

4.3. Tests de l'activité antagoniste

Après l'étape d'isolement et d'identification des souches fongiques, dont les résultats sont présentés dans le tableau précédent (tableau n°4) on a passé à la réalisation de la deuxième étape de notre travail expérimentale, il s'agit de l'étude de l'activité antagonistes de 08 isolats fongiques par deux méthodes, à savoir ; le teste de confrontation directe et la confrontation indirecte.

Le choix des combinaisons : Antagoniste/Pathogène est basé principalement sur les connaissances théoriques et les travaux publiés.

L'activité antagoniste d'un champignon à l'égard d'un autre champignon considéré comme pathogène est déduite par la diminution de la croissance mycélienne de ce dernier par rapport au témoin, ainsi que par des altérations morphologiques de son mycélium (Dendouga, 2017).

4.3.1. Test par confrontation directe

Alternaria sp. /Aspergillus niger

La combinaison entre ces 2 isolats a permis de remarquer une croissance rapide d'*Aspergillus niger*, où il atteint 80 mm de diamètre (Fig. 9) par rapport à ce d'*Alternaria sp.* qui atteint uniquement 21 mm après 5 jours d'incubation à 28 °C. Des travaux similaires sur le pouvoir de l'espèce *Aspergillus niger* sont rapportés par Ramzan et al. (2014).



Figure 9. Test de confrontation directe *Alternaria* sp. / *Aspergillus niger* sur PDA avec incubation à 28°C

***Aspergillus niger*/Geotrichum sp.**

L'observation quotidienne de la culture pendant 5 jours, a montré une croissance importante de l'isolat *Aspergillus niger* vis-à-vis de *Geotrichum* sp. Qu'il a présenté une colonie de 13 mm de diamètre en confrontation directe avec *Aspergillus niger*, occupant une colonie de 80 mm de diamètre (Fig. 10). En effet, après le 5^{ème} jour, on a observé même la capacité d'*Aspergillus niger* à envahir et à sporuler au-dessus de l'autre champignon. Peu d'études existent sur l'activité antagoniste des champignons du genre *Geotrichum*. Cependant, El-Tarabily et al. (2006) ont arrivé à démontrer la capacité antagoniste d'une espèce de *Geotrichum* contre les champignons phytopathogènes avec sa production en de mycotoxines.



Figure 10. Test de confrontation directe *Aspergillus niger* / *Geotrichum* sur PDA à 28°C

Fusarium sp. / Mucor sp.

Après cinq jours de confrontation directe entre *Mucor sp.* Et *Fusarium sp.*, on a noté une croissance faible de ce dernier (Fig. 11) avec une colonie de 1.8 mm de diamètre par rapport au témoin (l'isolat *Fusarium sp.* seul) . L'observation quotidienne de cette confrontation nous a permis également de noter des sécrétions colorées par l'agent *Mucor sp.* Blaschek et *al.* (1992) ont arrivé au même résultats, en les interprétant par la capacité des espèces appartenant au genre *Mucor* à produire une large gamme de mycotoxines et des enzymes lytiques puissantes renforçant le pouvoir mycoparasitaire de ce champignon.

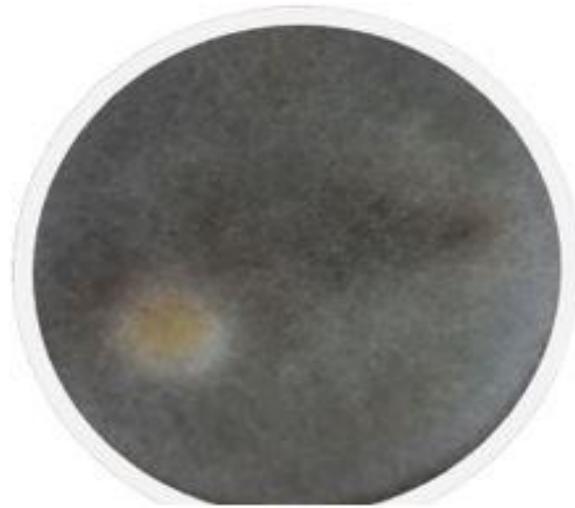


Figure 11. Test de confrontation *Fusarium sp. / Mucor sp.* Directe sur le milieu PDA avec incubation à 28C°

Alternaria sp. / Mucor sp.

Le test de confrontation directe entre ces deux champignons a permis de noter l'évolution de la croissance mycélienne de chaque colonie fongique (Fig. 12) en comparant les résultats obtenus par apport aux témoins, on a pu mettre en évidence l'effet inhibiteur directe de l'isolat *Mucor sp.* Vis-à-vis d'*Alternaria sp.*

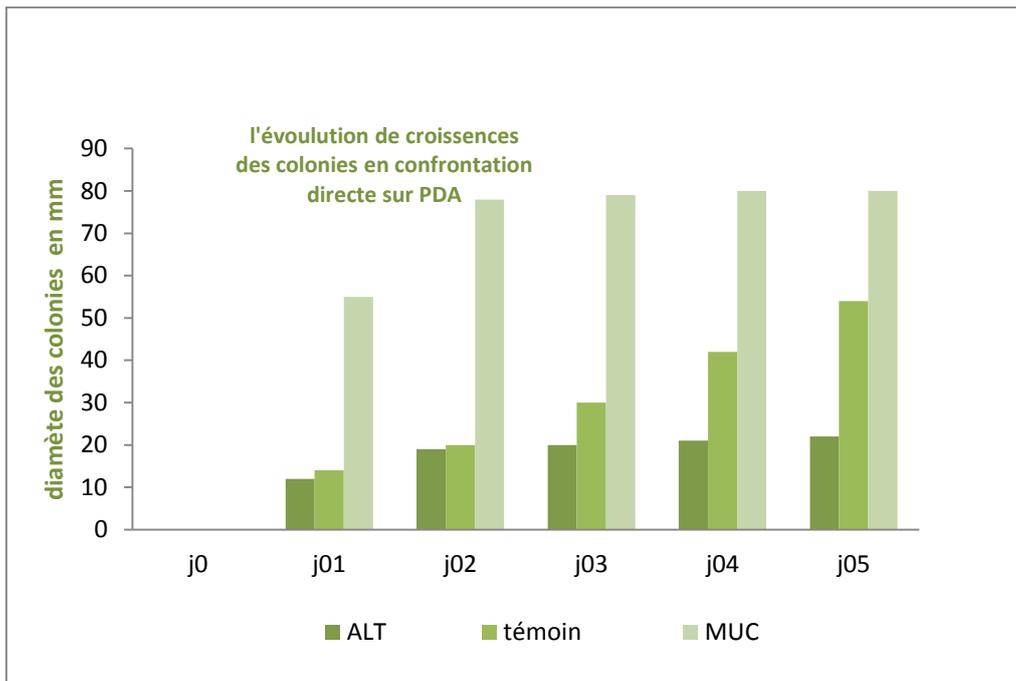


Figure 12. Evolution de la croissance mycélienne d'*Alternaria* sp./*Mucor* sp. en confrontation directe sur PDA à 28 °C.

Trichoderma sp. / *Aspergillus flavus*

La confrontation directe entre *Trichoderma* sp. et *Aspergillus flavus* a montré que le premier champignon a occupé plus de la moitié de la boîte Pétri après cinq jours d'incubation à 28°C, avec une colonie de 45 mm de diamètre pour *Aspergillus flavus* (Fig. 13). Ces résultats reflètent la capacité inhibitrice de *Trichoderma* sp. contre l'autre champignon. Le pouvoir mycoparasitaire de *Trichoderma* sp. Exercé à l'égard d'*Aspergillus flavus* est prouvé par des altérations morphologiques de ces dernières observées. Des résultats similaires sont rapportés Harman et al. (2004).



Figure 13. Confrontation directe entre *Trichoderma* sp./*Aspergillus flavus* sur PDA à 28°C.

Trichoderma sp. /Fusarium sp.

La confrontation directe entre le couplé *Trichoderma sp.* et *Fusarium sp.* nous a permis de remarquer une croissance rapide du premier champignon contre le deuxième (Fig.14). Autrement, *Trichoderma sp.* a pu inhiber la croissance mycélienne de *Fusarium sp.*, cette inhibition est traduite par la réduction du diamètre de la colonie de *Fusarium sp.* (20 mm) comparé au témoin (*Fusarium sp.* seul). Plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* sont réalisés sur l'activité antagoniste de *Trichoderma spp.* à l'égard de *Fusarium spp.* (Benhamou et al.,1997 ; Ramzan et al., 2014 ; Al-Shibli et al., 2019). Les notations quotidiennes de la croissance mycélienne des deux champignons après cinq jours d'incubation à 28 °C sont résumées dans le diagramme suivant.

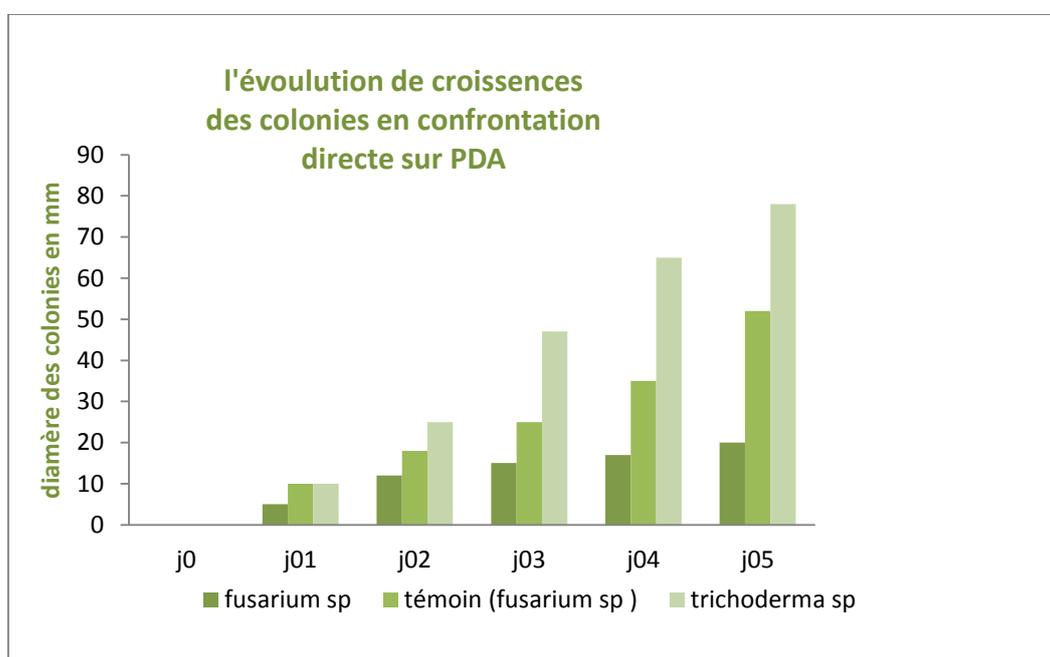


Figure 14. Evolution de la croissance de *Trichoderma sp. /Fusarium sp.* Par confrontation directe sur PDA à 28 à °C d'incubation

4.3.2. Test par confrontation indirecte***Alternaria sp. /Aspergillus niger***

Au cinquième jour d'incubation, la culture d'*Alternaria* a été totalement envahie par le mycélium de l'isolat *Aspergillus niger*, où *Alternaria sp.* a présenté une colonie de 21 mm. Ce résultat s'explique par une inhibition de la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* exercée par l'isolat appartenant à l'espèce *Aspergillus niger*. Plusieurs études sont réalisées sur des souches de l'espèce *Aspergillus niger*, rapportant la capacité antagoniste de cette espèce contre les

champignons phytopathogènes (Abdelzaher *et al.*, 2000 ; Ramzan *et al.*, 2014 ; Al-Shibli *et al.*, 2019).

Aspergillus niger/Geotrichum sp.

Le suivi quotidien de la combinaison *Aspergillus niger/Geotrichum sp.* (Fig.15) en confrontation indirecte a permis de noter une réduction considérable de la colonie d'*Aspergillus niger* (13 mm) comparé au témoin. Ce résultat confirme l'activité antagoniste de *Geotrichum sp.* à l'égard du champignon testé malgré l'absence d'un contact directe entre les deux isolats fongiques. Un résultat similaire est rapporté par El-Tarabily *et al.* (2006), interprété par la capacité de *Geotrichum spp.* à produire des substances volatiles inhibitrices de la croissance mycélienne et la sporulation d'*Aspergillus niger*.

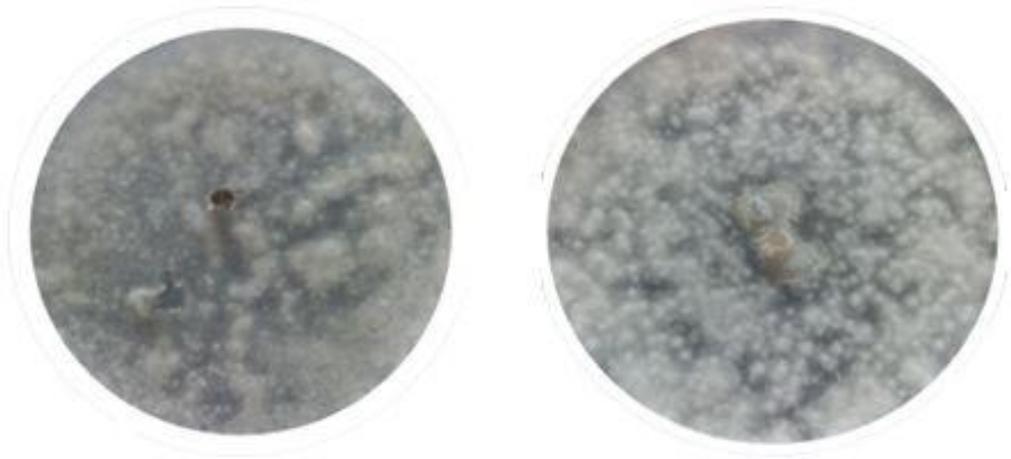


Figure 15. Test de confrontation indirecte *Aspergillus niger* / *Geotrichum sp.* sur PDA à 28°C

Fusarium sp./Mucor sp.

La confrontation indirecte entre *Fusarium sp.* et *Mucor sp.* a permis d'observer une grande réduction de la croissance mycélienne de *Fusarium sp.* par rapport au témoin (Fig. 16).

Cette réduction est traduite par la production des substances volatiles inhibitrices par *Mucor sp.* Un résultat similaire est annoncé par Blaschek *et al.* (1992), qui ont décrit que *Mucor* peut produire des mycotoxines volatiles attaquant le mycélium des autres organismes, en particulier les champignons, provoquant une altération profonde. Les mycotoxines peuvent également inhiber leur sporulation.

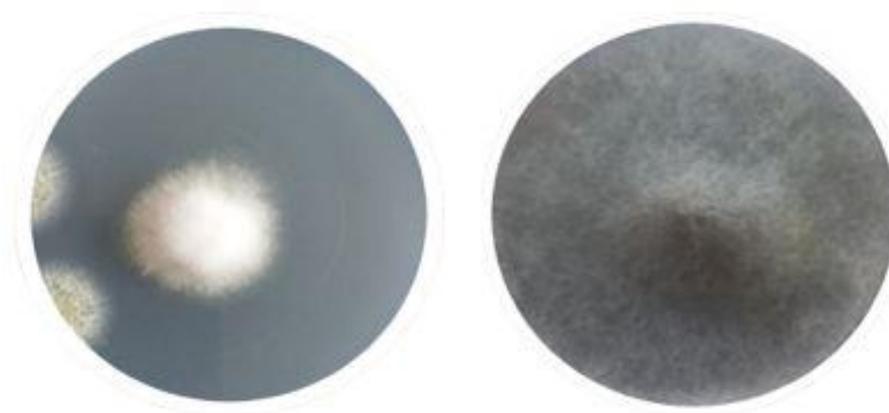


Figure 16. Test de confrontation indirecte *Fusarium* sp. / *Mucor* sp. sur PDA à 28 °C

***Alternaria* sp./*Mucor* sp.**

Ce test a permis de noter une réduction de la colonie d'*Alternaria* sp. occupant une surface de 33 mm au bout du cinquième jour d'incubation.(figure 17) Cependant, *Mucor* sp.a occupé presque la surface totale de la boîte. Cela est traduit par le pouvoir mycoparasitaire du *Mucor* sp. vis à vis l'agent pathogène également résultats confirmées par (Daami et al, 2001).

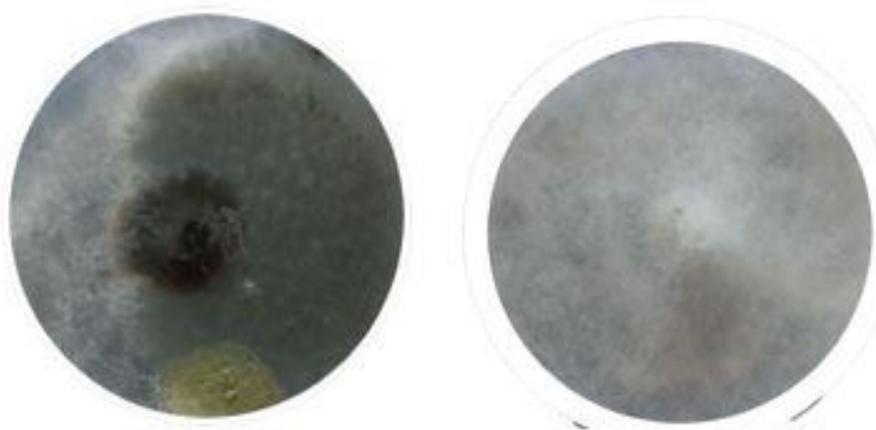


Figure 17. Test confrontation indirecte *Mucor* sp./*Alternaria* sp. sur PDA à 28 °C

Trichoderma* sp. /*Aspergillus flavus

Cette combinaison a permis de remarquer qu'il existe une inhibition de la croissance mycélienne exercée par *Trichoderma* sp. à l'égard d'*Aspergillus flavus*. Des résultats similaires ont été obtenus par Evans et al. (2003) affirmant l'existence d'un effet antagoniste exercé par *Trichoderma harzianum* in vitro contre *Aspergillus flavus* par les sécrétions antifongiques diffusibles.

Trichoderma sp. /Fusarium sp.

Après le cinquième jour de confrontation indirecte entre *Trichoderma sp.* et *Fusarium sp.* sur le milieu PDA à 28 °C (Fig. 18), on a pu noter une réduction de la colonie de *Fusarium sp.* Comparée au témoin. Cela est traduit par la capacité de *Trichoderma sp.* À produire des substances inhibitrices volatiles contre le *Fusarium*. Pates et *al.* (1999) ont constaté après plusieurs tests (in vitro et i vivo) que les souches appartenant au genre *Trichoderma* ont une production importante en substance volatiles.

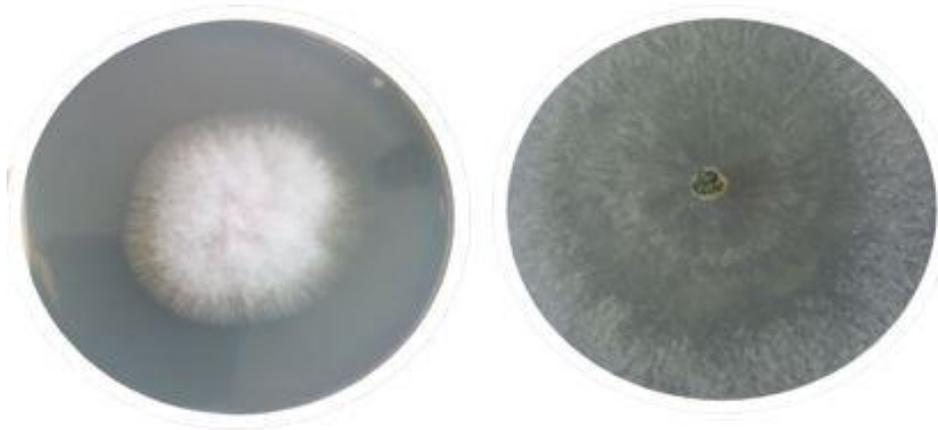


Figure 18. Résultat de test d'antagonisme par confrontation indirecte in vitro entre *fusarium sp.* et *trichoderma sp.* sur PDA avec incubation à 28°C°

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal du présent travail est d'isoler des champignons filamenteux à partir des parties aériennes des plantes malades pour leur utilisation dans la lutte biologique.

Dans la présente étude, on a pu isoler et purifier 09 des souches fongiques à partir des organes végétaux infectées. L'identification morphologique (macroscopique et microscopique) a permis de déterminer le genre de chaque isolat, et de rapprocher à l'espèce, qui reste à confirmer par les méthodes moléculaires. Les isolats obtenus appartiennent principalement au genre *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont les genres dominants dans les différents écosystèmes, en particulier le sol, ainsi que les matières organiques en décomposition.

L'activité antagoniste des isolats fongiques obtenus est testée par deux méthodes différentes, à savoir ; la confrontation directe et indirecte (à distance), dont le choix des combinaisons : Antagoniste/Pathogène est basé principalement sur les connaissances théoriques et les travaux publiés.

Les tests de confrontation directe ou indirecte ont révélé la capacité du champignon considéré comme antagoniste à inhiber la croissance mycélienne de l'autre champignon en combinaison. Cela est constaté suite à une comparaison du diamètre de la colonie du champignon considéré comme pathogène par rapport au témoin (le même champignon seul). En confrontation directe, la réduction du diamètre de la colonie fongique révèle la capacité de certains champignons à produire des substances inhibitrices diffusibles dans le milieu gélosé, qui sont des toxines et des enzymes, principalement de la classe des hydrolases. Avec le même test a observé la capacité de certains champignons antagonistes à sporuler au-dessus de la colonie fongique de l'autre champignon en combinaison, révélant le pouvoir mycoparasitaire du champignon antagoniste. En confrontation indirecte, la réduction de la croissance mycélienne des champignons filamenteux testés, a permis de mettre en évidence la capacité des champignons antagonistes à produire des substances inhibitrices volatiles, d'où leur effet à distance.

En perspectives ;

- ✓ L'identification moléculaire des isolats obtenus pour la confirmation de leur identité.
- ✓ Elargir l'isolement dans le but d'obtenir plusieurs isolats du genre *Trichoderma*, considéré comme le champignon le plus important dans la lutte biologique.
- ✓ Tester l'activité antagoniste *in vivo*, et sous serre.
- ✓ Produire et purifier les métabolites ciblés comme agents principales dans l'activité antagoniste.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abdelzaher, H. M. A; Gherbawy, Y. A. M. H ; and Elnaghy, M. A. (2000). Damping-off disease of maize caused by *Pythium deliense* in El-Minia, Egypt and its possible control by some antagonistic soil fungi. *Egypt. J. Microbiol.* 35:21-45.
2. Alabouvette, C ; Cordier, C .(2018). Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes innovation, Agronomiques, INRAE, 69. (10.15454/UIJG8L)
3. Bills, G. F. (1996). Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution.*, 31-65.
4. Blaschek, W; Käsbauer, J; Kraus, J; and Franz, G. (1992). *Pythium aphanidermatum*: Culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1 → 3),(1 → 6)-β-d-glucans. *Carbohydr. Res.* 231:293-307.
5. Bouchet P., Giraud J.L., and Vihard J., 1999 *Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée.* Masson, 190p
6. Bouchet, P. Guignard, J.-L. Pouchus, Y.-F, 2005, *Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée.* 2^{ème} édition, Masson.191p.
7. Bouzerzour H. et Monneveux Ph.(1990) . Analyse des facteurs de stabilité du rendement de l'orge dans les conditions des hauts plateaux de l'Est algérien. In *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale.* Montpellier (France). INRA Ed (Les colloques n°64).
8. Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gow, N.A. (1994). *The Fungi.* Trends in Microbiology, 2 (12), pp.500.
9. Champion, R. (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. Edition Erreur Permies INRA. France.
10. Crozet A., Canard B., 2016-*Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique,* Mémoire de master en pharmacie, Université Grenoble Alpes, 104p.
11. Daami- Remadi M; and El Mahjoub M. (2001). Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. L'INRAT*74, p. 167–186

12. Davet, P., & Rouxel, F. (2000). Identification et isolement des champignons phytopathogènes. Editions Quae. P63,96.
13. Drougard, M. 2018 - Compréhension et contrôle de la morphologie des champignons filamenteux en milieu liquide. Thèse de doctorat, École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIÉS).
14. Dendouga, W. (2017). Impact des facteurs écologiques sur les moisissures antagonistes et productrices des enzymes hydrolytiques. Thèse doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1. P 74-75.
15. Duponnois, R., Ramanankierana, H., Hafidi, M., Baohanta, R., Baudoin, É., Thioulouse, J., Sanguin, H., Bâ, A., Galiana, A., Bally, R., Lebrun, M., Prin, Y. (2013). Des ressources végétales endémiques pour optimiser durablement les opérations de réhabilitation du couvert forestier en milieu méditerranéen et tropical : exemple des plantes facilitatrices vectrices de propagation des champignons mycorrhiziens. *Comptes Rendus Biologies*, 336(5-6), pp. 265-272.
16. Dufresne. PH., 2018. Identification des champignons d'importance médicale. Stage de laboratoire, laboratoire de santé publique du Québec.64p.
17. El-Tarabily, K. A; and Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* 38 :1505-1520
18. Hatakka, A., Hammel, K.E. (2011). Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. In : *Industrial. Applications* [en ligne]. S.l. : Springer, Berlin, Heidelberg. *The Mycota*, 319-340Genevès L., 1992-Biologie Végétale: thallophytes et micro-organismes, Dunod. Paris, 159p.
19. Kendrick, B. (2000). *The fifth kingdom (anglais) broché (éd. 3)*. (f. P. Co, éd.)
20. Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., Kahmann, R. (2015). Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), pp.513–545.
21. Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Grube, M. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American journal of botany*, 91(10), pp.1446-1480.
22. Nigg, M., Bernier, L. (2017). Large-scale genomic analyses of in vitro yeast-mycelium dimorphism in human, insect and plant pathogenic fungi: From ESTsto RNAseq experiments. *Fungal biology reviews*, 31(3), pp.131-142.

23. Pate, John S., et al. "Seedling growth and storage characteristics of seeder and resprouter species of Mediterranean-type ecosystems of SW Australia." *Annals of Botany* 65.6 (1990): 585-601.
24. Peixoto-Neto P.A.S. 2002. Microorganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2002: 62-76
25. Perry J. J., Staley J. T. & Lory, S. 2004. *Microbiologie*. Dunod, Paris, p.228. Petersen M. et Daniel R. 2006. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *World journal of microbiology & Biotechnology*. 22: 431-435
26. Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A. 2003. *Microbiologie*. DE Boeck et Larcier SA. Bruxelles. 1088 p.
27. Ramzan, N; Noreen, N; and Shahzad, S. (2014). Inhibition of in vitro growth of soil-borne pathogens by compost-inhabiting indigenous bacteria and fungi. *Pak. J. Bot.* 46:1093-109.
28. Ramirez C. (1982). *Manual and atlas of the Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam: 231-236
29. Raven P.H., Evert F. et Eichhorn Susan E. 2000. *Biologie végétale*, Edition: Paris. 968p.
30. Raven P. H., Evert R. F. et Eichhorn S. E. 2003. *Biologie végétale*. De Boeck, Paris. P
31. Raven. P., Johnson B, Jonathan, L., Jules. B., Susan. R-S., Kenneth. A-M., Georges. B-J, 2007, *biologie végétale*. 7^{ème} édition, Bruxelles, 1250p.
32. Smith, L. (2010). Biological control in agricultural systems. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 77-86). Academic Press.
33. Sylvie P. 2015. *La classification des champignons*. Laboratoire de botanique, phytochimie et mycologie / umr -cnrs 5175 cefe, faculté de pharmacie, France.
34. Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannangara, S. D., & Promputtha, I. (2020). Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 40.
35. Thatoi, H., Behera, B. C., & Mishra, R. R. (2013). Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. *Mycology*, 4(1), 54–71.
36. Thuillier, A. (2013). *Diversité fonctionnelle des Glutathion Transférases fongiques: caractérisation des classes Ure2p et GTT2 de Phanerochaete chrysosporium*. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

37. Van Lenteren, J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57(1), 1-20.
38. Villard, B. P. L.(1999). Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. (e. Masson, éd.) Département des sciences biologiques de l'environnement.
39. Whipps,J.K.(1997).developpement in the biologicale control of soil-borne plant pathogens.advances in botanical research 26, p1-134.
40. White, J. F., Torres, M. S., & Sullivan, R. F. (2018). Utilization of microbial agents in the control of plant diseases. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 455-472). Springer.

Site internet:

1. <http://www.itdas.dz/>

Annexes

Annexe 01

Préparation des milieux de cultures

- Le milieu « PDA »

La gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA) est un milieu nutritif microbiologique utilisé couramment pour cultiver des champignons fongiques.

Composition : en gramme par litre d'eau distillée.

- 200g/L de pomme de terre.
- 20g/L de glucose.
- 15 à 20g/L d'Agar-agar.
- 1L d'eau distillé.
- Gentamicine 40mg/ml

Les étapes de préparation de milieu PDA additionné de Gentamicine :

- ✓ On fait bouillir 200 g de pomme de terre coupée en petits morceaux dans l'eau pendant 20 minutes.
- ✓ On récupère le suc de pomme de terre avec un tissu filtrant.
- ✓ On ajoute 20 g d'AGAR et 20 g de glucose.
- ✓ On ajuste avec l'eau distillée pour atteindre un volume final de 1 L et on laisse le mélange s'homogénéiser sur une plaque agitatrice pendant 20 minutes.
- ✓ L'ajout de 125 ml de l'antibiotique gentamicine 40mg/ml dans le mélange , La Gentamicine permet d'inhiber la plupart des colonies bactériennes .
- ✓ La stérilisation de mélange par autoclave à 121 c°/100 kPa pendant 15 a 20 minutes. (Botton et al., 1990) (.
- Le milieu SB « sabouraux » :

Le **milieu gélosé de Sabouraux** est un milieu sélectif pour la culture fongique et principalement utilisé pour l'isolement des champignons pathogènes et non pathogènes.

Composition : en gramme par litre d'eau distillée.

- 65 g de poudre.
- 1L d'eau distillé.

Les étapes de préparation de milieu SB :

- ✓ On Verse 65 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- ✓ On laisse le mélange s'homogénéiser sur une plaque agitatrice pendant.
- ✓ Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète sur une plaque agitatrice /chauffante.
- ✓ Stérilisation de mélange 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

Annexe 02

Les espèces fongiques isolées dans chaque méthode par chaque échantillon

	Méthode utilisée	Echantillon 01	Echantillon 02	Echantillon 03
<i>Aspergillus niger</i>	M01	05	02	01
	M02	01	–	–
<i>Trichoderma sp.</i>	M01	–	03	–
	M02	–	–	–
<i>Géotrichum sp.</i>	M01	–	–	03
	M03	–	–	–
<i>Aspergillus flavus</i>	M01	01	01	01
	M02	04	–	–
<i>Alternaria sp.</i>	M01	01	01	01
	M02	–	–	–
<i>Aspergillus nudullante</i>	M01	01	–	–
	M02	–	–	–
<i>Aspergillus fugumati</i>	M01	01	–	–
	M02	01	–	–
<i>Fusarium sp.</i>	M01	01	01	–
	M02	–	–	–
<i>Pinicilium sp.</i>	M01	01	02	
	M02	01	–	
<i>Muccor sp.</i>	M01	03	02	01
	M02	–	–	–

Annexe 03

L'observation quotidienne de la croissance des empèses combinées au bout des 5 jours d'incubation à 28C° dans le milieu PDA.

		24 h	48h	72h	96h	120h
ASP1/GEO	GEO	9	10	13	13	13,5
	ASP1	33	50	85	80	80
TRI/ASP2	ASP2	35	40	44	45	45,5
	TRI	24	40	45	47	48
ALT/MUC	ALT	12	19	20	21	22
	MUC	55	78	79	80	80
PINI /ASP2	PINIV	6	15	17	19	20
	ASP2	25	60	78	80	80
MUC/FUS	FUS	10	13	14	14,5	14,5
	MUC	60	75	80	80	80
PINI/FUS	FUS	9		20	21	12,5
	PINI 1	25	30	75	80	80
PINI/ASP1	PINI1	30	11	25	27	27,2
	ASP1	15	70)		78	80

Annexe 04

L'observation quotidienne de la croissance des empèses combinées en confrontation indirecte au bout des 5 jours d'incubation à 28C° dans le milieu PDA.

		24 h	48h	72h	96h	120h
ASP1/GEO	ASP1	9	10	13	13	13,5
	G2O	33	50	85	80	80
TRI/ASP2	ASP2	14	22	25	28	38
	TRI	24	40	60	72	80
ALT/MUC	ALT	19	20	24	26	28
	MUC	55	78	79	80	80
ALT/FUS	ALT	10	20	22	25	26
	FUS	30	66	78	80	80
ALT/ASP1	ALT	9	14	16	18	20
	ASP1	60	75	80	80	80
	FUS	9		20	21	12,5
TRI/FUS	MUC	25	30	75	80	80
	FUS	30	11	25	27	27,2
	TRI	15	68		78	80

Annexe 05

L'évolution de diamètres des colonies témoins des champignons fongiques isolées durant les 120heurs d'incubation à 28°C.

	0H	24H	48H	72H	96H	120H
TRI	0	20	23	30	40	70
GEO	0	16	22	30	35	42
PINI	0	27	32	76	82	84
MUC	0	41	52	67	73	80
ASP1	0	30	61	76	79	82
ASP2	0	27	62	79	81	82

Annexe 06

Les maladies phytopathogènes causées par les souches fongiques isolées :

La souche fongique	La maladie causée	Les symptômes de la maladie
<i>Aspergillus niger</i>	moisissure noire pourriture des fruits, ou la contamination des grains	Nécrose des tissus Déformation des tissus Pourriture Apparition de spores
<i>Géotrichum sp.</i>	Géotrichose Pourriture des fruits	des taches blanches ou grises devenant poudreuses sur les tissus infectés
<i>Aspergillus flavus</i>	Aspergillose des fruits Aspergillose des céréales Aspergillose des plantes à fibres	décomposition molle, des taches brunes à noires et une production de spores.
<i>Alternaria sp.</i>	Alternariose Alternariose des fruits Alternariose des légumes Alternariose des cultures céréalières	des lésions foliaires de forme caractéristique, des taches brunes à noires avec des bords concentriques, et éventuellement une défoliation
<i>Aspergillus nudillante</i>	Aspergillose	décomposition molle, des taches brunes à noires et une production de spores.

<i>Aspergillus fugumati</i>	Aspergillose	décomposition molle, des taches brunes à noires et une production de spores.
<i>Fusarium sp.</i>	Fusariose Pourriture des racines Pourriture des fruits Fusariose de l'épi	le flétrissement, la décoloration des tiges et des feuilles, des lésions nécrotiques et une réduction de la croissance. des taches brunes à noires, une décomposition molle et une production de spores fongiques.
<i>Pinicilium sp.</i>	Pourriture des fruits Moisissure des légumes Moisissure du sol	des taches molles, décolorées et souvent moisies sur les fruits, qui peuvent se propager rapidement et entraîner la décomposition complète du fruit.
<i>Muccor sp.</i>	Mucorose	une pourriture rapide et molle des tissus végétaux, souvent accompagnée d'une abondante production de spores fongiques

Résumés

Résumés

ملخص

من أجل عزل الفطريات الخيطية لاستخدامها في مكافحة البيولوجية، تم جمع 89 عينة من العديد من الأنواع النباتية المزروعة في معهد إيتيداس لعين بن نوي (بسكرة). كشف التعريف العياني والمجهري عن 09 عزلات مختلفة تنتمي إلى الأجناس: *Trichoderma* و *Penicillium* و *Aspergillus* و *Mucor* و *Alternaria* و *Geotrichum* و *Fusarium*. يدرس النشاط العدائي للفطريات المعزولة من خلال اختبارين مختلفين، وهما: المواجهة المباشرة والمواجهة عن بعد (غير المباشرة). يتم إجراء القياسات اليومية لنمو الفطرين مجتمعين (الموزعة على PDA عند 28 درجة مئوية) في كلا الاختبارين. سمحت هذه القياسات باستنتاج القوة المثبطة للنمو الفطري الذي يمارسه *Trichoderma* sp.، *Aspergillus Niger* sp.، *Mucor* sp. فيما يتعلق بالرشاشيات والنكهة والفساريوم sp. والبديل sp. على التوالي في المواجهة المباشرة. في المواجهة غير المباشرة، تعزل *Trichoderma Sp.*، *Geotrichum Sp.* و *Mucor sp.* قدرة على تقليل النمو الفطري *fusarium* sp. و *alternaria* sp.، مما يعكس قدرتها على إنتاج مواد مثبطة متطايرة على الرغم من عدم وجود الاتصال المباشر بين الفطرين.

الكلمات الرئيسية: الفطريات الخيطية، العزلة، النشاط العدائي، مكافحة البيولوجية.

Résumé

Dans le cadre d'isoler des champignons filamenteux pour leur utilisation dans la lutte biologique 89 échantillons ont été collectés à partir de plusieurs espèces végétales cultivées à l'institut ITIDAS d'Ain ben naoui (Biskra). L'identification macroscopique et microscopique a permis de mettre en évidence 09 isolats différents appartenant aux genres ; *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Geotrichum* et *Fusarium*. L'activité antagoniste des champignons isolés est étudiée par deux tests différents, à savoir ; la confrontation directe et la confrontation à distance (indirecte). Des mesures quotidiennes de la croissance des deux champignons en combinaison (ensemencés sur PDA à 28°C) sont effectuées dans les deux tests. Ces mesures ont permis de déduire le pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne exercé par *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus Niger* à l'égard de *aspergillus*, *flavus*, *fusarium* sp. et *alternaria* sp. respectivement en confrontation directe. En confrontation indirecte, les isolats *trichoderma* sp., *géotrichum* sp., et *mucor* sp. ont pu réduire la croissance mycélienne de *fusarium* sp., *aspergillus niger* et *alternaria* sp., ce qui reflète leur capacité à produire des substances volatiles inhibitrice malgré l'absence d'un contact directe entre les deux champignons.

Mots-clés : Champignons filamenteux, isolement, activité antagoniste, lutte biologique.

Summary

In order to isolate filamentous fungi for their use in biological control 89 samples were collected from several plant species grown at the ITIDAS Institute of Ain ben naoui (Biskra). Macroscopic and microscopic identification revealed 09 different isolates belonging to the genera: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Geotrichum* and *Fusarium*. The antagonistic activity of isolated fungi is studied by two different tests, namely: direct confrontation and (indirect) remote confrontation. Daily measurements of growth of the two fungi in combination (seeded on PDA at 28°C) are performed in both tests. These measurements allowed to deduce the inhibitory power of mycelial growth exercised by *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus Niger* in respect of *Aspergillus*, *Flavus*, *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. respectively in direct confrontation. In indirect confrontation, the isolates *trichoderma* sp., *geotrichum* sp. and *mucor* sp. were able to reduce mycelial growth of *Fusarium* Sp., *Aspergillus Niger* and *Alternaria* Sp., which reflects their ability to produce inhibitory volatile substances despite the absence of direct contact between the two fungi.

Keywords: Filamentous fungi, isolation, antagonistic activity, biological control.