

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPEREURE  
ET DE LE RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**Université Mentouri Constantine**  
**Faculté des sciences de la Nature et de la vie**  
**Département de Biochimie et de la Microbiologie**



**Mémoire présentée**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en microbiologie  
Option : Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production des substances fongiques

Intitulé :

L'effet inhibiteur de *Pythium sp.* sur la croissance mycélienne  
de *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata*

Présentée par : **Mme BOUNEGHOU SAMIA BATOUL**

**Jury d'évaluation :**

Président : **KACEM CHAOUCHE. N.**

Encadreur : **MR. DEHIMAT. L.**

Co-encadreur : **BOUZIANE. Z.**

Examineur : **M<sup>me</sup> DJAZAR. I.**

**M<sup>elle</sup> ABDELAZIZE. W.**

**MC. Univ. Mentouri, Constantine**

**MC. Univ. Mentouri, Constantine**

**MC.Uni.Mohamed Seddik Benyahia,Jijel**

**MC. Univ. Mentouri, Constantine**

**MC. Univ. Mentouri, Constantine**

Année universitaire  
2010-2011

# Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A Mr DEHIMAT

Merci de votre patience et de votre disponibilité dans les bons comme dans les mauvais moments.

A mon marie Rahman qui est toujours tout près de moi, pour me soutenu et m'encouragé.

A mon enfant Anes que j'aime beaucoup .

A mes très chers parents, qui m'ont toujours enseigné la persévérance dans mes études et qui m'ont toujours encouragé ; que dieu les protège.

A mon frère : Abdelatif et sa fiançais Rima

A mes sœurs : Randa , Rayene.

A ma belle famille : ma mère Zhaira , et mon père Abdlakrim , et mes frères et sœurs : Nadia, Nabila, Nida, Walid et seif.

A mes petites oiseaux : Souheib , Rahil, Soundous, Nibél.

A tous les membres des famille : Bouneghou, Talhi et filali.

A mes meilleures amies : merièm, sana , Mounira et touts ceux qui j'aime.

**Batoul**

# Remerciement

J'exprime mes remerciements et ma profonde gratitude, avant tout au bon dieu qui m'a donné la force et volonté d'élaborer ce modeste travail.

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à monsieur DEHIMAT L. mon responsable de stage, qui a dirigé mon travail ; ses conseils et ses commentaires précieux m'ont permis de surmonter mes difficultés et de progresser dans mes études je voudrais également exprimer mes remerciements sincères à Melle Bouziane Zahira qui par son enthousiasme, m'a aussi donné beaucoup de propositions tout au long de ce projet.

Je remercie les différents membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail ; mon encadreur Monsieur DEHIMAT L. qui est le maitre de conférences et doyen dans la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour l'intérêt qu'il accorde à ce travail en acceptant de l'examiner.

J'aimerais pouvoir dire un grand merci à tous ceux qui ont rendu l'ambiance si agréable au sein de notre promotion Sana, Meriem, Farida, Mounira, Mounia, Asma, Insaf.....je vous remercie pour les excellents moments passés ensemble.

**Batoul**

# Sommaire

1- Introduction.....	1
2- Aperçue bibliographique.....	2
2.1- Généralité sur <i>Pythium sp.</i> .....	2
2.1.1- Genre <i>Pythium sp.</i> .....	2
2.1.2- Caractères généraux.....	2
2.1.3- Taxonomie.....	3
2.1.4- Habitat.....	4
2.1.5- les facteurs de croissance.....	5
2.1.6- Le mycoparasitisme du <i>Pythium sp.</i> .....	5
2.1.7- Activité et mode d'action.....	5
2.2- Généralité sur <i>Fusarium roseum</i> .....	6
2.2.1- Identification.....	6
2.2.2- Morphologie.....	6
2.2.3- Croissance.....	7
2.2.4- Habitat.....	7
2.2.5- Taxonomie.....	8
2.2.6- Biologie et biochimie.....	8
2.2.7- Maladies provoqué par <i>Fusarium roseum</i> .....	10
2.2.8- Effet sur la santé humaine.....	11
2.3- Généralité sur <i>Alternaria alternata</i> .....	12
2.3.1- Définition.....	12
2.3.2- Morphologie.....	12

2.3.3- Habitat.....	13
2.3.4- Classification .....	13
2.3.5- Description et croissance.....	13
2.3.6-Biologie et biochimie.....	14
2.3.7- Maladies provoqué par <i>Alternaria alternata</i> .....	15
2.4- Mécanismes de l'antagonisme entres les champignons.....	17
2.4.1- Définition de l'antagonisme.....	17
2.4.2- La diversité fongique liée aux différent écosystèmes.....	17
2.4.3- les types d'antagonisme.....	18
2.4.3.1- Compétition.....	18
2.4.3.2-L'hyperparasitisme.....	18
2.4.3.3- Production de sidérophores.....	18
2.4.3.4-L'antibiose.....	19
3- Matériels et méthodes.....	20
3.1- Matériels biologique.....	20
3.2- Méthodologie de travail.....	20
4- Résultats et discussion.....	23
4.1-étude de la croissance mycélienne de <i>Pythium sp.</i> sur les différents milieux de cultures.....	23
4.2-Confrontation direct sur milieu de culture entre <i>Pythium sp.</i> et <i>Fusarium roseum</i> .....	26
4.3- Confrontation directe sur milieu de culture entre <i>Pythium sp.</i> et <i>Alternaria alternata</i> .....	28

<b>5- Conclusion et perspectives.....</b>	<b>31</b>
<b>6- Résumé.....</b>	<b>33</b>
<b>7- Summary.....</b>	<b>34</b>
<b>8- ملخص.....</b>	<b>35</b>
<b>9- Bibliographie.....</b>	<b>36</b>

## Liste des figures et des tableaux

<b>Figure 1</b>	Aspect macroscopique et microscopique du <i>Pythium sp.</i> .....	2
<b>Figure 2</b>	Le mycoparasitisme du <i>Phytophthora infestans</i> par les hyphes de <i>Pythium oligandrum</i> ...4	
<b>Figure3</b>	Développement du <i>Fusarium roseum</i> sur PDA.....	6
<b>Figure4</b>	Aspect microscopique du <i>Fusarium roseum</i> .....	7
<b>Figure 5</b>	Cycle biologique du <i>Fusarium roseum</i> .....	8
<b>figure 6</b>	La progression de la fusariose dans les épis.....	10
<b>Figure 7</b>	Progression de la pourriture des semences .....	10
<b>Figure 8</b>	Aspect macroscopique d' <i>Alternaria alternata</i> .....	12
<b>Figure 9</b>	Aspect microscopique des spores d' <i>Alternaria alternata</i> .....	13
<b>Figure 10</b>	Culture d' <i>Alternaria alternata</i> sur milieu Malt-Agar .....	14
<b>Figure 11</b>	Culture d' <i>Alternaria alternata</i> sur milieu CYA.....	14
<b>Figure 12</b>	<i>Altarnaria altarnata</i> sur feuilles.....	14
<b>Figure 13</b>	<i>Alternaria alternata</i> sur tubercule.....	16
<b>Figure 14A.</b>	Confrontation équidistante du <i>Pythium sp.</i> et du <i>Fusarium roseum</i> par contact direct sur milieu PDA.....	21
<b>Figure 14B.</b>	Confrontation équidistante du <i>Pythium sp.</i> et d' <i>Alternaria alternata</i> par contact direct sur milieu PDA.....	22
<b>Figure 15</b>	Développement du <i>Pythium sp.</i> sur milieu PDA.....	23
<b>Figure 16</b>	Développement du <i>Pythium sp.</i> sur milieu Czapek- DOX.....	23
<b>Figure 17</b>	Développement du <i>Pythium sp.</i> sur milieu Malt.....	24
<b>Figure 18</b>	Courbes de croissance sur les différents milieux .....	25

<b>Figure 19.</b> Effet inhibiteur par confrontation directe du <i>Pythium sp.</i> sur la croissance mycélienne du <i>Fusarium roseum</i> ; pour une durée d'incubation de six jours à 26 °C .....	26
<b>Figure 20</b> Comparaissant entre le développement mycélien du <i>Fusarium roseum</i> traité par confrontation direct avec le <i>Pythium sp.</i> et leur témoin.....	26
<b>Figure 21</b> Effet inhibiteur par confrontation directe du <i>Pythium sp.</i> sur la croissance mycélienne du <i>d'Alternaria alternata</i> . .....	28
<b>Figure 22</b> Comparaissant entre le développement mycélien <i>d'Alternaria alternata</i> traité par confrontation direct avec le <i>Pythium sp.</i> et leur témoin.....	28
<b>Tableau 1</b> Résultats du développement du <i>Pythium sp.</i> sur les 4 milieux de culture.....	24
<b>Tableau 2</b> les résultats de confrontation direct entre <i>Fusarium roseum</i> et <i>Pythium sp.</i> et leur pourcentage d'inhibition exercé .....	27
<b>Tableau 3</b> Représente les résultats obtenus par confrontation direct entre <i>Alternaria alternata</i> et <i>Pythium sp.</i> et leur pourcentage d'inhibition exercé .....	29

## I. Introduction

Depuis quelques années, le monde agricole s'oriente vers une agriculture durable et raisonnée afin de préserver l'environnement et améliorer la sécurité alimentaire en développant le concept de protection biologique intégrée (lutte biologique) (Picard *et al.*, 2000)

Le concept de protection biologique intégrée consiste à chercher une optimisation économique et écologique des moyens de contrôle des ennemis des cultures (qui peut être atteinte par la coordination de plusieurs tactiques), pour maintenir les dégâts dans la production végétale en deçà d'un seuil économique critique tout en minimisant les éventuelles conséquences néfastes de ce maintien pour l'homme, l'animal, les plantes et l'environnement (O. T .A .U.S, 1990)

Dans le but de chercher d'autres alternatives de lutte biologique contre les champignons pathogènes agressifs, qui entraînent des pertes économiques, nous étudions dans ce travail l'interaction entre une espèce de *Pythium sp.* vis – vis le *Fusarium roseum* et *Alternaria alternata*

Pour but d'éliminer les dégâts causer par ces deux pathogènes. On note que :Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements des feuilles supérieures, la perte de vigueur de la plante, la base de la tige se couvre de bande brun jaunâtre; et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (Pitt *et al.*,1994)

Pour *Alternaria alternata* qui se localise seulement au niveau des feuilles avec des taches brunes tyrans vers jaunâtre, provoquent l'alternariose (Criquet *et al.*,2008).

Notre objectif était de vérifier la capacité de *Pythium sp.* à coloniser le milieu et savoir la possibilité d'éliminer ces micro-organismes pathogènes.

Le présent travail consiste donc à étudier *in vitro* l'interaction entre le *Pythium sp.* et ces deux champignons (*Fusarium roseum* et *Alternaria alternata*) par contacte direct.

## I. Généralité sur *Pythium sp.*

### 1- Genre *Pythium sp.*

Le nom *Pythium* est donné à un genre de micro-organismes classés parmi les *oomycètes* qui est un groupe qui comprend plusieurs champignons phytopathogènes économiquement importants avec ces dégâts et ces bénéfiques. Le genre *Pythium* se divise en deux types d'espèces ; des parasites de plantes et quelques autres parasites d'animaux. (Anonyme 1, 2007).

### 2- Caractéristiques généraux

#### 2.1- Morphologie

*Pythium sp.*, comme d'autres, dans la famille des *Pythiacées*, sont généralement caractérisées par leur production des hyphes coenocytique, d'environ 7  $\mu\text{m}$  de diamètre ; sans hyphes cloisons. (C. André et al. 2004). à croissance rapide (20 mm par jour sur PDA à 26°C) Contiennent généralement une seule oospore (Vander et al, 1991) La plupart des espèces de *Pythium sp.* produisent des sporanges ronds. Le sporange contient une vésicule à paroi mince dans laquelle les zoospores se différencient. Par la suite, les zoospores sont relâchées. (André et al., 2004) (Figure1)



**Figure 1** : Aspect macroscopique et microscopique du *Pythium sp* ( Vander et al.,1991)

## 2.2- Cycle de vie

Le diploïde (2N) l'étape de vie qui prédomine, avec une brève haplophase lancée au cours de la reproduction sexuée ainsi que la reproduction asexuée (Homothallism prédomine dans la famille) pour fusionner les gamètes. (Paulitz et Baker, 1997).

### ✓ Reproduction sexuée

Oogones terminales ou intercalaires, parfois latérales, de diamètre varie entre 21-31  $\mu\text{m}$ , oospores aplérotiques de 18-27  $\mu\text{m}$  de diamètre, à paroi épaisse de 1-2,8  $\mu\text{m}$ . Anthéridies souvent absentes, parfois 2 par oogone, diclines, et parfois monoclines, présentant souvent des constriction, et lobulées. (Vander et al., 1991)

### ✓ Reproduction asexuée :

Elle n'est observée que chez *Pythium ultimum* var. *sporangiferum*; les sporanges germe à l'intermédiaire d'un germe de tube ou par la libération de mobiles zoospores, Selon les espèces et les conditions environnementales. Sporangies intercalaires, rarement terminales, en agrégats irréguliers formés d'éléments subglobuleux ; Zoospores formées à 18-20°C, de 9-10  $\mu\text{m}$  de diamètre ; Tube de décharge de 15-35  $\mu\text{m}$  (Vander et al., 1991)

## 3- Taxonomie du *Pythium* sp. Selon (Pringsheim, 1858)

**Domaine :** *Eukaryota*  
**Sous-règne :** *Chromista*  
**Infra-règne :** *Stramenopiles*  
**Division :** *Oomycota*  
**Classe :** *Oomycetes*  
**Sous-classe :** *Saprolegniomycetidae*  
**Ordre :** *Pythiales*  
**Famille :** *Pythiaceae*  
**Genre :** *Pythium* sp.

#### 4- Habitat

*Pythium sp.* est un champignons ubiquiste, vivent sur terre (terrestres) , et dans l'eau (aquatiques) et une combinaison des deux (amphibie) ; mais il est principalement retrouvé dans les régions humides. (Anderson *et al.*, 1993) Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres : • sol • bois • plastique • papier • produits alimentaires (céréales, tomates au niveau des racines et tiges) • algues .

#### 5- Les facteurs de croissance

La température optimale de croissance est comprise entre 22 et 30 °C ou on peut trouver Une bonne croissance dans cet intervalle. Mais pour des températures de 6 et 32 °C on peut également observée quelque mycélium. ( Domsch *et al.*, 1993)

Ø Quelques cas exceptionnels de croissance ont été observés à 37 °C, mais aucune à 0°C.

Ø Le point thermique de mortalité dans le sol est de 49 à 55 °C pendant 30 minutes .

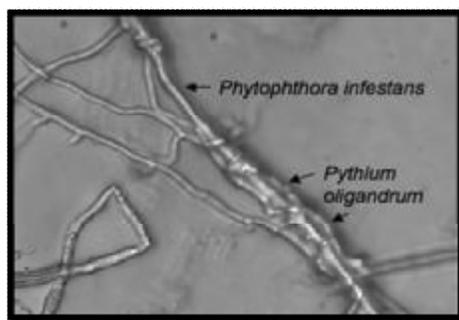
Ø Le pH doit être compris entre 1,5 et 7 , le pH optimum étant de 4,5-5,5. (Domsch *et al.*, 1993)

#### 6- Le mycoparasitisme du *Pythium sp.*

Le *Pythium oligandrum* est un Hyperparasite de *Pythium ultimum* , *Botryotrichum piluliferum*, *Gaeumannomyces graminis...* En culture, il entre en compétition avec *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma viride* .Des études sont en cours afin d'exploiter *Pythium oligandrum* comme agent de lutte biologique . (Anderson *et al.*,1993)

##### ü Exemple du mycoparasitisme du *Pythium oligandrum*

Cette image microscopique, elle exprime le processus du développement mycoparasitaire du *Pythium oligandrum* vis-à-vis *Phytophthora infestans*.(Figure2)



**Figure 2** Le mycoparasitisme du *Phytophthora infestans* par les hyphes de *Pythium oligandrum* (Vander, 1991)

## 7- Activité et mode d'action

*Pythium oligandrum* agit comme un hyperparasite en colonisant d'autres champignons pathogènes avec un effet inhibiteur qui supprime la croissance d'au moins 20 champignons pathogènes, y compris *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Ophiostoma*, *Phoma*, *Pseudocercospora*, *Pythium*, *Sclerotinia* et *Sclerotium* dans ou autour des plantes en pleine croissance. (Anonyme2 ; 2007). *Pythium oligandrum* produit le **oligandrin** hormone de protéines et d'autres composés qui stimulent les parois cellulaires des plantes pour repousser l'invasion des agents pathogènes, et stimule les mécanismes naturels de défense des plantes appelée pathogenesis-related (PR), ces protéines qui aident les plantes à résister aux maladies, sans nuire à la plante. (Anonyme2; 2007)

### ✓ *Pythium oligandrum* et l'homme

Des tests appropriés trouvés aucune preuve que le champignon est toxique pour les humains ou d'autres mammifères. Pas d'effets toxiques ou pathogènes de *Pythium oligandrum* chez les mammifères ont été rapportés dans la littérature publique disponible ou dans les données soumises. En outre, certaines caractéristiques biologiques de *Pythium oligandrum*, qui comprennent son humidité et de température durant l'infection, sont d'autres indications que cet agent microbien de lutte antiparasitaire ne serait pas pathogène pour les mammifères. (Anonyme2 ,2007)

### ✓ Évaluation des risques pour l'environnement

Les études disponibles montrent que pas d'effets environnementaux négatifs sont attendus lorsque des produits contenant des *Pythium oligandrum* sont utilisés conformément. (Anonyme 2, 2007).

## II. *Fusarium roseum*

### 1- Identification

Le genre *Fusarium* tire son nom du latin *fuscus* car ses spores sont en forme de fuseau.

*Fusarium* ; est une moisissure cosmopolite classé parmi les Ascomycètes, s'isole du sol, de l'eau, de l'air et de nombreux végétaux , qu'il parasite le plus souvent, entraînant des pertes sévères dans les cultures. (Pitt, J. I , *et al.*,1994). Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (Benhamou *et al.*, 1997). Le *F. roseum* est souvent identifié par la pourriture rose-beige à rouge brique qu'il développe à la base de la tige malade.

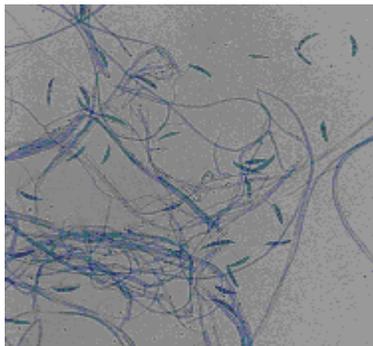
### 2-Morphologie

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées. Généralement, les conidiophores sont isolés ou regroupés en acervulus ou sporodochium ,Les macroconidies sont septées et les microconidies sont le plus souvent unicellulaires. Les cultures sont d'aspects et de couleurs très variés (Larone ;1995); la plupart des *Fusarium* ont une forme de faucille pour ces macroconidies. Les Microconidies sont moins de la moitié de la taille des macroconidies, et ont tendance à croître dans des chaînes.( Larone, 1995) (Figure3)



**Figure3** Développement du *Fusarium roseum* sur PDA

- **Aspect microscopique**



**Figure4** *Fusarium roseum* Détail de spores asexuées (conidies), pluricellulaires observées au microscope optique. (Fouchard, INRA)

### 2.3- Croissance

*Fusarium roseum* pousse bien sur la gélose de pomme de terre (PDA) avec une vitesse de croissance importante on donnant des colonies de couleurs allant du blanc vers le rose. Il est capable de produire des macroconidies et des microconidies, environ 4 par 14µm (Deshpande et Koppikar, 1999). *Fusarium roseum* est un agent pathogène des plantes qui a besoin d'au moins vingt-quatre heures on température maintenue au-dessus de 18 ° C à infecter l'hôte (Booth, 1997) Sur certains milieu de culture; *Fusarium roseum* devient rouge ; il secrète des substances ou bien des colorants ;qui n'est pas commun chez tout les espèces de *Fusarium*. ( Kendall, 2008) Le genre *Fusarium* contient plus que 20 espèces. Les plus connus sont : *Fusarium solani* , *Fusarium oxysporum* , *Fusarium chlamydosporum* , *Fusarium roseum*, et *Fusarium subglutinans* (Hoog et al., 2000).

### 4- Habitats

Tous les *Fusarium* se développent bien sur les plantes et dans le sol. Et pour *F. roseum*, en particulier pousse bien sur, le maïs, l'avoine et le blé. Cette espèce aime forte teneur en azote et peut vivre heureux dans le sol aussi longtemps que le potassium et de phosphore restent faibles ( Burgess et Liddell, 1997). Pour que les *Fusarium* se développent, il faut une humidité relative de 100 % pendant 48 à 60 heures (Béatrice, 2001). Les pluies d'orage constituent des situations idéales pour leur développement. Il faut aussi une température supérieure à 20 °C ( Béatrice, 2001) .

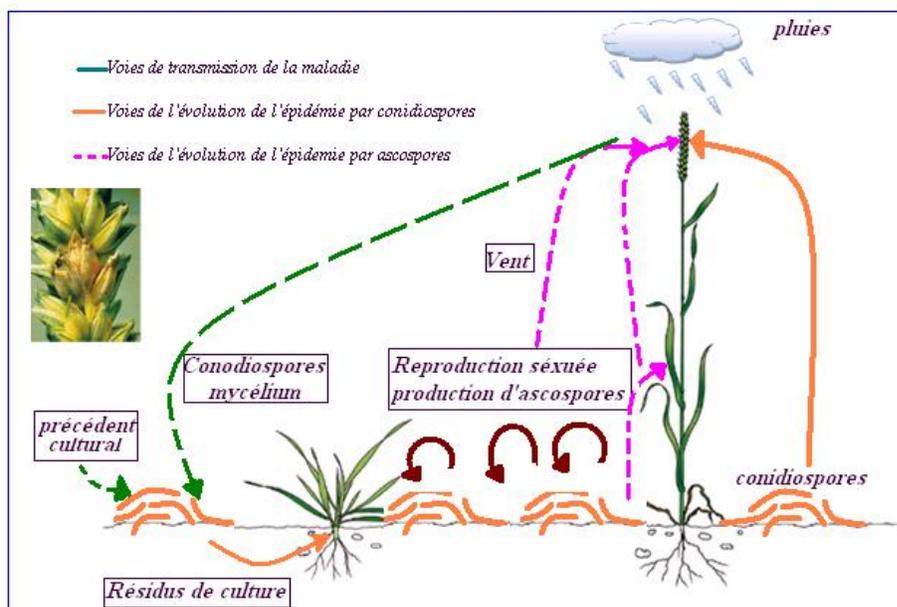
## 5. Taxonomies (Link ex Gray ; 1821)

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Hypocreomycetidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Famille</b>	<i>Nectriaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Fusarium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Fusarium roseum</i>

## 6- Biologie et biochimie

Les *Fusarium* peuvent se conserver dans le sol pendant plusieurs mois sous forme de chlamydospores ou de mycélium capable de se propager sur les débris végétaux.

Des conidies se forment au niveau de coussinets roses sur les débris végétaux et à la base des tiges atteintes de Piétin. ( Kendall .2008). La biologie de ce *Fusarium* se différencie des autres espèces qui on responsables de la maladie du Fusariose du pied . Ses attaques restent localisées au-dessus du sol et ne touchent pas les racines. Le champignon se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores. Les agglomérats (= sporodochies) de microconidies sont pigmentés de rouge. Le champignon produit également des macroconidies.( Snyd. et Hansen ,1999)(Figure5)



**Figure 5** Cycle biologique (BASF , 2008)

Le climat est le facteur principal de développement des fusarioses. Les pluies (ou hygrométrie élevée) au moment de la floraison sont propices à leur développement. Les champignons se conservent après la récolte sur les résidus de culture ou sur les semences. La contamination peut s'effectuer selon plusieurs voies. Des ascospores peuvent se développer sur des résidus de culture et être véhiculées par le vent sur les feuilles et les épis. Les conidiospores qui se forment galemment sur des débris de récolte ou sur les étages inférieurs de la plante peuvent se propager par les éclaboussures de pluie sur les premières feuilles de la plante ou à partir des premières, sur les étages supérieurs. (Parry *et al.*, 1995). L'infection se produit au moment de l'ouverture des glumes et la chute des étamines. Il semble que les anthères constituent une bonne porte d'entrée aux champignons.

### Ü Les mycotoxines synthétisé par le *Fusarium*

Les *Fusarium* sont connus pour leur aptitude à synthétiser certaines mycotoxines sur la plante,. Les quantités et les types de mycotoxines varient selon les souches de *fusarium* présents sur les plants. Aujourd'hui, les principales mycotoxines surveillées dans les produits alimentaires sont la déoxynivalénol (DON) et la zéaralénone (ZEA) produites par *F. graminearum* (Parry *et al.*, 1995). On les retrouve à la récolte, dans l'immense, mais des pics de contamination sont parfois observés.

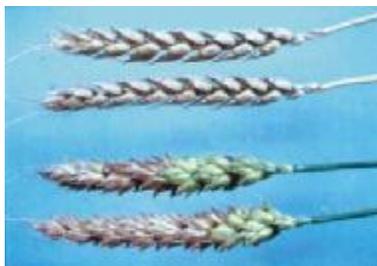
- **La zearalénone** ou toxine F-2 (3, 10, 11), métabolite fongique du groupe des polykétides (nonakétides) (12), élaboré par divers *Fusarium* sp. (Schaafsma *et al.*, 1998)

### 7- Les maladies provoqué par le *Fusarium*

L'infection est favorisée par des stress thermiques (fortes ou faibles températures) et un forte humidité ; grâce à ces conditions on peut site quelque maladies:

#### ✚ Fusariose de l'épi :

Les symptômes de la fusariose de l'épi sont décelables peu après la floraison. Les épillets atteints (glumes et fleurons) semblent avoir mûri (blanchi) prématurément par comparaison aux épis sains qui sont vert (Maaro, 2009) (Figure 6)



**Figure 6** La progression de la fusariose dans les épis (Vidal, INRA 2004)

#### **Pourriture des semences, fonte des semis et pourritures des racines**

Des fusarium qui colonisent les semences et le sol sont responsables de la pourriture des semences et de la fonte des semis en début de saison ainsi que de la carie du grain ( Parry *et al.*, 1995) (Figure7)



**Figure 7** Progression de la pourriture des semences (Vidal, INRA 2004)

La fonte des semis est causée par plusieurs organismes parmi eux *Fusarium roseum*. Bien des plantules ne lèvent pas ou lèvent, mais paraissent jaunes et comportent de la pourriture brune ou brun-rouge à la base de leur tige. (Maaro; 2009)

#### **Les fusarioses estivales**

Causer par *Fusarium roseum* ; caractérisé par des Taches circulaires, irrégulières, de 5 à 90cm s'étendant rapidement ; avec Feuillage vert-jaunâtre à jaune havane ,et un mycélium rose.  
Les tache reviennent souvent au même endroit d'année en année.

## 8-Effet sur la santé humaine

Depuis une vingtaine d'années, on sait que certaines espèces de *Fusarium* sont susceptibles de réaliser de graves infections opportunistes surtout chez les personnes immuno-déprimées. Les spores de fusarium aéroportées et inhalés, ou ingérées avec la nourriture, peuvent être une source importante de problèmes de santé. (Mayayo *et al.*, 1999)

Quelques espèces (*Fusarium* du groupe *roseum*) peuvent produire de puissantes toxines (mycotoxines), qu'on trouve parfois en concentrations significatives sur des grains ou des produits dérivés. Ingérées par des animaux ou par l'homme, elles peuvent provoquer de graves intoxications alimentaires, éventuellement mortelles, avec risque cancérigène. Ces toxines peuvent affecter les systèmes circulatoire, digestif, cutané et nerveux. (Hoog *et al.*, 2000) Les symptômes peuvent inclure la nausée, le vomissement, la diarrhée, la dermatite et hémorragie interne. Les spores peuvent se développer sur les yeux (première cause de kératomycose), dans les sinus, sur la peau et les ongles et sont susceptible de provoquer de la fièvre des foins et l'asthme. Ils causent fréquemment des lésions de la peau chez les patients brûlés, des mycoses des ongles, de l'otomycose, des ulcères variqueux, le mycétome, des ostéomyélites ou des infections disséminées. Les infections dues aux *Fusarium* spp. sont collectivement regroupées sous le terme de fusarioses. ( D'après l'association Terre sacrée; 2000)

### III. *Alternaria alternata*

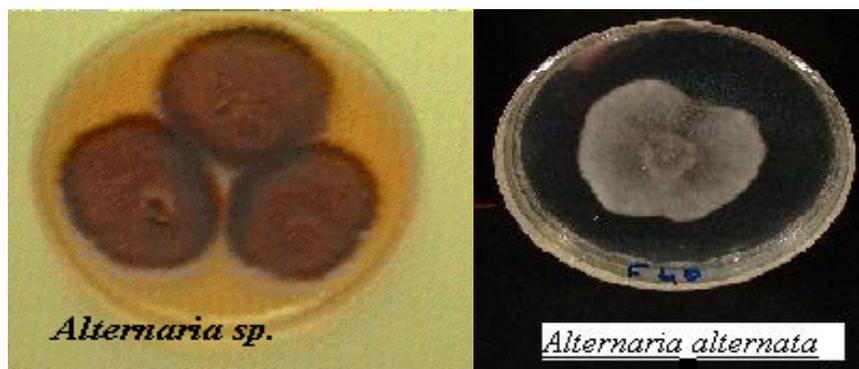
#### 1- Définition

*Alternaria alternata* est un champignon filamenteux cosmopolite ubiquiste. communément isolé à partir de plantes, de sols ,de nourriture corrompue ainsi que de l'air ambiant des habitations. (Criquet *et al.*,2008). *Alternaria* est un Pathogène de végétaux ; se comporte surtout comme un parasite de faiblesse et se développe sur des plantes sénescents, sur des légumes, sur des débris organiques divers, sur le sol, sur des produits alimentaires, sur le papier etc.(Anonyme 4 ; 2006)

#### 2 - Morphologie

##### 2.1- Aspect macroscopique d'*Alternaria alternata*

Les colonies d'*Alternaria* ont une croissance rapide et aspect cotonneux. La surface des colonies est souvent hétérogène, présentant des zones blanches constituées exclusivement d'hyphes aériennes et des zones sombres rasantes renfermant les spores asexuées mélanisées. ( Criquet *et al.*,2008)(Figure 8)



**Figure 8** Aspect macroscopique d'*Alternaria alternata*

##### 2.2- Aspect microscopique d'*Alternaria alternata*

Les hyphes sont septées. Les conidiophores sont bruns, septes et ont souvent l'aspect de « zigzags ». Ils portent des conidies simples ou ramifiées. Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques du genre *Alternaria*. Des tubes germinateurs peuvent également être observés à la surface des conidies Principaux champignons allergisants (Figure 9).



**Figure 9** : Spores d'*Alternaria alternata* ( Criquet et al.,2008)

### 3- Habitat

Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres :

- audiovisuel ; bois ; caoutchouc ; matières synthétiques ; papier ; plantes ; produits alimentaires (fruits, légumes, céréales, noix...); sol ; textile (coton, jute, laine) *Alternaria alternata* est également très fréquent. sa croissance a été mise en évidence sur de nombreux substrats. Plus de 50 % des prélèvements de poussières de matelas de logements humides en contiennent (Botton,1990 ; Breton *et al.*, 1985)

### 4 - Classification taxonomique selon (Haksworth , 1994)

<b>Règne</b>	<i>Champignons</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Euascomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pleosporales</i>
<b>Famille</b>	<i>Pleosporaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Alternaria</i>
<b>Espèce</b>	<i>Alternaria alternata</i>

### 5 - Description et croissance

#### 5.1- Aspect des colonies après 21 jours de croissance à 26°C

##### ü Sur milieu Malt-Agar (MA) (pH 6,5)

*Alternaria alternata* est une espèce à croissance relativement rapide. Les colonies veloutées et rases avec une périphérie blanche sont brun-gris à noires. Le revers est marron foncé à noir. La croissance aérienne de ce champignon est presque entièrement constituée de chaînes de spores.

Les conidiophores sont 1 à 3 septes, lisses, droits ou flexueux, noirs et ont une croissance sympodiale; Ils mesurent en moyenne 50 x 5 µm. Les conidies bourgeonnent à travers un ou

plusieurs pores de la paroi du conidiophore, en chaînes simples ou ramifiées ; ces conidies pluricellulaires sont brunes à jaune-brun, en forme de massue avec un rostre apical. Leur taille est de 60 x 15µm. Le milieu est légèrement acidifié ( pH final 5). (Raty 1994) (Figure 10)



**Figure 10** Culture d'*Alternaria alternata* sur milieu Malt-Agar (MA) (pH 6,5) (Raty ;1994)

#### ü Culture sur milieu CYA (pH 5,5)

Sur milieu CYA (pH 5,5) Colonies à croissance très rapide atteignant son maximum de croissance au bout de 6 jours d'incubation. Colonies veloutées avec un réseau mycélien dense de couleur brun-gris. Le revers montre un aspect brun-noir. L'espèce basidifie le milieu (pH final 7) (Figure11)



**Figure 11** Culture d'*Alternaria alternata* sur milieu CYA (pH 5,5) (Raty ,1994)

## 6- Biologie (Subramanian CV1993)

ü *alternata* est une espèce saprophyte et tonophile facultatif (Requiert des conditions moyennes d'humidité)= Aw 0,85-0,88

ü Croissance optimale obtenue à la température de 25°C et à pH 4-5,4. Mais ce champignon peut se développer dans une gamme de pH assez large allant de 2,7 à 8et pour température maximal entre30-32°C.

ü Contenu en eau des spores : 86% ; sous des conditions très sèches, elles restent viables pendant plusieurs années.

✚ *Alternaria alternata* est une espèce cellulolytique ; elle utilise les éléments suivants comme source de carbone : D-galactose ; maltose ; raffinose ; saccharose.

Et comme source d'azote : acétamine ; acétate et oxalate d'ammonium ; acide L-aspartique ; acide L-glutamique ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ; Glycine ; peptone ; urée . ( Inoue ,1994)

## 7- Maladies provoqué par *Alternaria alternata*

### 7.1-Taches alternariennes

*Domages* : Les taches brunes tirant vers le brun jaunâtre, circulaires, de petites à grandes, dispersées sur la feuille peuvent être causées par des champignons des genres *Alternaria*. Ce sont généralement des agents pathogènes faibles, qui peuvent également vivre en saprophytes sur les tissus morts. Les taches foliaires causent rarement d'importants dégâts dans les cultures.

(Halonen *et al.*, 1997)

### 3.7.2- L'alternariose

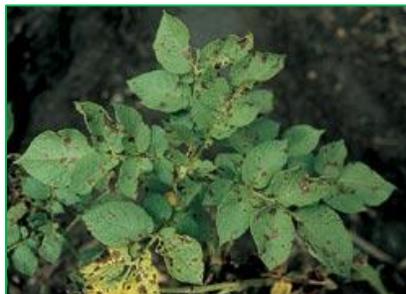
Provoquée par *Alternaria alternata* ; La maladie provoque surtout des dégâts en climat continental, chaud et sec, mais est accentuée en culture irriguée. L'alternariose est favorisée par la sénescence des plantes et des conditions climatiques bien précises :

- température élevée (20-25°C) et rosée pendant la nuit pour permettre l'infection,
- alternance de périodes humides et ensoleillées pour la formation des conidies et la sporulation.

La dispersion des spores est assurée par le vent et les éclaboussures de pluie ( Kwon-Chung et Bennett. 1992).

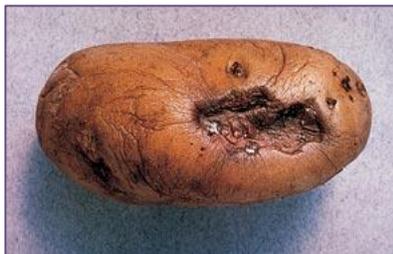
#### • Description des symptômes

Sur feuilles : taches nécrotiques, bien délimitées, de taille variable, situées plutôt sur les feuilles du bas ; présence d'anneaux concentriques sur les taches importantes (Figure 12).



**Figure 12** *Altarnaria altarnata* sur feuilles

Sur tubercules : pourritures brunes à noires, très sèches, assez typiques, avec une dépression (Figure13).



**Figure 13** *Alternaria alternata* sur tubercule

### 7.3-Allergie

*Alternaria* est une des principales moisissures impliquées en allergologie. Cette moisissure, dominante dans l'air inhalé en été s'isole aussi tout au long de l'année dans de nombreux logements. Elle présente, de plus, des épitopes communs avec d'autres moisissures comme *Ulocladium*, *Stemphylium*, *Phoma*, etc. *Alternaria alternata* est incontestablement l'espèce la plus étudiée en immunoallergologie. Les 3 espèces citées en allergologie, *Alternaria alternata*, *Alternaria longipes* et *Alternaria tenuissima*, sont très proches du point de vue immunologique et possèdent également le même profil ITS.

L'allergie à *Alternaria* s'exprime surtout sous forme d'asthme bronchique et de rhinite, saisonnière ou non. Chez les enfant, *Alternaria* serait même devenue la troisième cause de sensibilisation respiratoire, juste après les acariens et les pollens de Graminées. De plus, l'exposition à des quantités élevées de spores d'*Alternaria alternata* est un facteur de risque d'arrêt respiratoire chez des enfants et des jeunes adultes asthmatiques. (Halonen *et al.*, 1997)

## IV. Mécanismes de l'antagonisme entre les champignons

### 1- Définition de l'antagonisme

Ce terme est souvent pris dans un sens très large, notamment dans les ouvrages traitant de lutte biologique. Nous utilisons ici dans un sens beaucoup plus restreint, pour désigner la situation où un organisme exerce un effet inhibiteur sur un autre organisme qu'il tend à éliminer sans le consommer. L'antagonisme présente donc une étape bien définie entre l'amensalisme (situation - 0) et la compétition (situation où, comme nous le verrons, les deux partenaires sont en difficulté) (Davet, 1996). Beaucoup d'antagonistes existent certainement dans la nature et exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogènes des plantes. L'homme a toujours essayé d'augmenter l'efficacité des antagonistes à travers l'introduction de nouvelles grandes populations de ces microorganismes au champ où elle n'existe pas, ou à travers la stimulation de leur croissance en apportant des amendements au sol. Dans les deux cas, le résultat est un accroissement des activités inhibitrices des antagonistes contre les pathogènes. Bien que certains cas de lutte biologique efficace aient été enregistrés, le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement au laboratoire et sous serre, les résultats au champ ne sont pas d'habitude d'un succès particulier (Nasraoui, 2006).

### 2- La diversité fongique liée aux différents écosystèmes

#### 2.1- Pathogène de sol

Parmi les champignons antagonistes les plus communs, il y a des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium*, particulièrement *T.harzianum* et *G.virens*, qui sont efficaces contre plusieurs pathogènes comme des espèces de *Phytophthora*, *Alternaria* et *Fusarium*.

#### 2.2- Pathogène aériens

Nasraoui (2006), a démontré que plusieurs micro-organismes antagonistes, principalement les champignons, ont été prouvés protéger des plantes hôtes contre des pathogènes aériens : la levure *Pichia guilliermondii* est efficace contre les pathogènes *Botrytis* et *Penicillium*. Plusieurs maladies ont été réduites en utilisant des antagonistes telles que *Tuberulina maxima* contrôlant *Cronartium ribicola* sur le pin blanc. Presque tous les antagonistes aux pathogènes aériens ne sont pas encore utilisés dans la lutte pratique contre les maladies des parties aériennes des plantes.

### 2.3- Pathogènes des produits conservés

Plusieurs maladies fongiques de produit conservé peuvent être contrôlées en utilisant des champignons antagonistes, principalement les levures. Ainsi, la moisissure verte causée par *Penicillium digitatum* est contrôlée par *Trichoderma viride*, que plusieurs levures, telles que *Candida oleophila*, protègent les fruits contre les moisissures dues à *Botrytis*, *Penicillium* et *Rhizoctonia* (Narraoui, 2006)

## 3- Les types d'antagonisme

L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou une antibiose (Soufiane, 1998).

### 3.1- Compétition

Il s'agit de la lutte de deux ou plusieurs espèces pour l'utilisation d'une même ressource qui peut être de l'espace ou de la nourriture. Une population d'une espèce qui possède un avantage compétitif dans l'appropriation d'une ressource, s'assure du contrôle de cette ressource et élimine les populations d'autres espèces appartenant au même peuplement (Lévêque et al., 2001).

### 3.2- L'hyperparasitisme

Le parasitisme est une forme de relation dans laquelle un organisme (le parasite) tire de l'hôte les ressources détournées à leur profit d'une partie des ressources normalement destinées à la croissance, la survie et la reproduction des hôtes, bien qu'ils soient le plus souvent invisibles, les parasites n'en sont pas moins omniprésents.

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel (Gagné, 1984). On peut mentionner chez les champignons (mycoparasitisme) ou un champignon est parasité par un autre champignon (Chet, 1990).

### 3.3- Production de sidérophores

Les sidérophores sont des molécules extracellulaires qui possèdent une grande affinité pour le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ). Ce dernier est présent dans le sol à faible concentration sous forme de  $Fe(OH)_3$ .

Les champignons et toutes les bactéries aérobiques et anaérobiques facultatives produisent une grande variété de sidérophores (Lynch, 1990 ; Kapulnik, 1996).

Le phénomène d'antagonisme peut se manifester aussi soit par une inhibition de la germination des spores des champignons. Ce phénomène est connu sous le nom de mycostase soit par une lyse du mycélium des champignons c'est la mycolyse, ou par la lyse des bactéries (bactériolyse) qui est un

phénomènes peut être fréquent qu'on va s'intéresser plus particulièrement à ces phénomènes à cause de leur importance dans le domaine de la lutte contre les champignons phytopathogènes (Soufiane,1998).

### **3.4- L'antibiose**

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes.

D'autres provoquent la distorsion des hyphes fongiques, modifiant l'aspect des colonies ou entraînant le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité membranaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique; ceci est lié à l'adoption fréquente de protocoles de sélection *in vitro* de souches antagonistes qui favorisent ce mécanisme et à la simplicité expérimentale de telles études. Cependant, la production d'antibiotique dans un milieu de culture ne signifie pas automatiquement que l'antibiotique est synthétisé *in vivo*, et même si c'est le cas, qu'il joue un rôle dans cette protection *in vivo*. Par contre, l'antibiose n'a jamais été mise en évidence chez les levures antagonistes vis-à-vis de phytopathogènes (Lepoivre,2003).

## 2-Matériels et méthodes

### 1- Matériels biologiques

**L'agent pathogène :** Les isolats : *Fusarium roseum* et *Alternaria alternata*. Utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir des racines et des tiges de plante identifier et conserver sur milieu gélosé au laboratoire de mycologie appliqué, département de biochimie et microbiologie, UM Constantine.

Les souches sont réactivées, puis cultivées dans un milieu PDA et incubée à température 26°C pendant 7jours.

**L'agent antagoniste :** L'agent antagoniste utilisé pour lutter contre *Fusarium roseum* et *Alternaria alternata* c'est le *Pythium sp.* ce dernier est isolé à partir des racines de plante identifier puis conservé sur milieu gélosé au même laboratoire.

### 2- Méthodologie de travail

#### 2.1/ Etude de la croissance mycélienne de *Pythium sp.* sur différent milieux de cultures

- La vitesse de croissance de *Pythium sp.* a été étudiée sur différent milieu de culture.

Des disques de 4 mm de diamètre sont prélevés à partir de la cultures pures de *Pythium sp.*, puis déposés au centre des boites de Petri contenant les milieu suivant :

PDA ; Czapek-Dox ; Malt et Sabouraud .

Les boites sont incubées à la température de 28°C. Après 24 heures, la vitesse de croissance est mesurée et notée chaque jour pendant une semaine .Trois répétitions ont été réalisées pour chaque milieu.

#### 2.2-Activité antagoniste *in vitro* du *Pythium sp.* vis-à-vis *Fusarium roseum* et

##### *Alternaria alternata*

-L'activité antagoniste *in vitro* du *Pythium sp.* est testé selon la technique du contacte directe sur milieu de culture.

##### A-*Pythium sp.* & *Fusarium roseum*

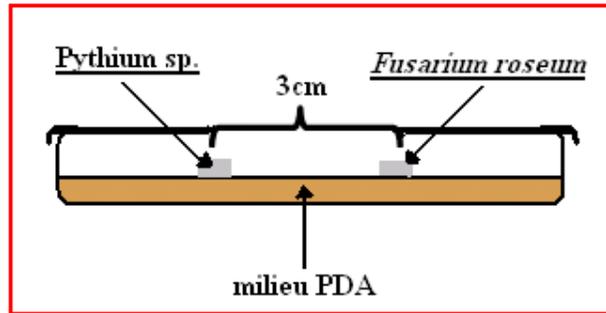
#### ✓ Confrontation par contact direct sur milieu de culture :

- Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA (200g pomme de terre, 20g D-glucose, 20g agar ,1L eau distillé, ajuster le pH à 6 et stérilisé le milieu) ; deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant le *Pythium sp.* pure. et l'autre *Fusarium roseum* pure. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à

équidistance du centre de la boîte (**Figure 14A**) ; les repiquages sont effectués en même temps (Benhamou et Chet, 1996).

L'incubation est réalisée à 26°C pendant six jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies du *Fusarium roseum* et leur envahissement par le mycélium du *Pythium sp.* sont effectuées chaque jour jusqu'à le sixième jour.

Le témoin est constitué par un repiquage du pathogène seul (*Fusarium roseum*) au centre de la boîte de pétri qui contient le PDA.



**Figure 14A** Confrontation équidistante du *Pythium sp.* et du *Fusarium roseum* par contact direct sur milieu PDA

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins.

L'évaluation de l'inhibition exercée par *Pythium sp.* est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996) :

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

Où :

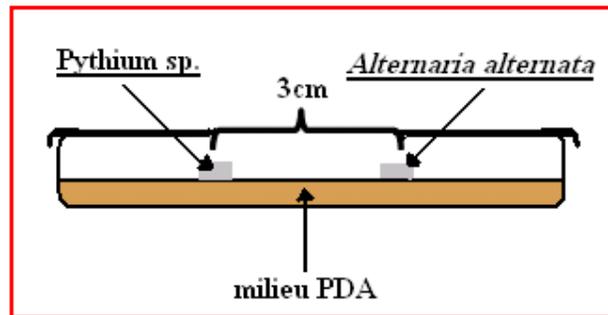
**I(%)** est pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

**C<sub>n</sub>** est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste

**C<sub>o</sub>** le diamètre moyen des colonies témoins.

***B-Pythium sp. & Alternaria alternata*****✓ Confrontation par contact direct sur milieu de culture :**

On a réalisé le même protocole de travail avec la souche d'*Alternaria alternata* (Figure14B)



**Figure 14B** Confrontation équidistante du *Pythium sp.* et d' *Alternaria alternata* par contact direct sur milieu PDA

### 3-Résultats et discussion

#### 1- Etude de la croissance mycélienne de *Pythium sp.* sur les différents milieux de cultures

-L'étude de la croissance mycélienne du *Pythium sp.* nous permettons de savoir leur vitesse de croissance on variant les milieux de culture pour trouver le milieu idéal pour une bonne culture.

- L'étude macroscopique qui consiste à visualiser l'aspect des colonies, nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

##### a- Sur milieu PDA (pH initial 5.5 et température 28°C )



**Figure 15** Développement du *Pythium sp.* sur milieu PDA

*Pythium sp.* présente un mycélium aérien de couleur blanchâtre les premiers jours de son développement, avec une croissance rapide ; puis dans quelques jours il donne un aspect cotonneux. Il se répartit de façon homogène sur la boîte de pétri.

##### b- Sur milieu Czapek- Dox (pH initial 5.5 et température 28°C )



**Figure 16** Développement du *Pythium sp.* sur milieu Czapek- Dox

Colonies à croissance un peu plus lente que sur les autres milieux; d'aspect rayonné avec un mycélium transparent (légèrement blanc) ; se répartit de façon homologue sur la boîte de pétri. Sont développement pendant une semaine reste mycélien, donc , la présence du mycélium seulement

**c- Sur milieu: Malt (pH initial 5.5 et température 28°C )**



**Figure 17** Développement du *Pythium sp.* sur milieu Malt

*Pythium sp.* possède un développement très rapide par rapport aux autres milieux de culture avec une vitesse =30 mm/jour ; qui se caractérisent par la présence d'un mycélium plus ou moins dense, avec des filaments aériens de couleur blanchâtre qui se varient vers une couleur plus foncée avec le temps.

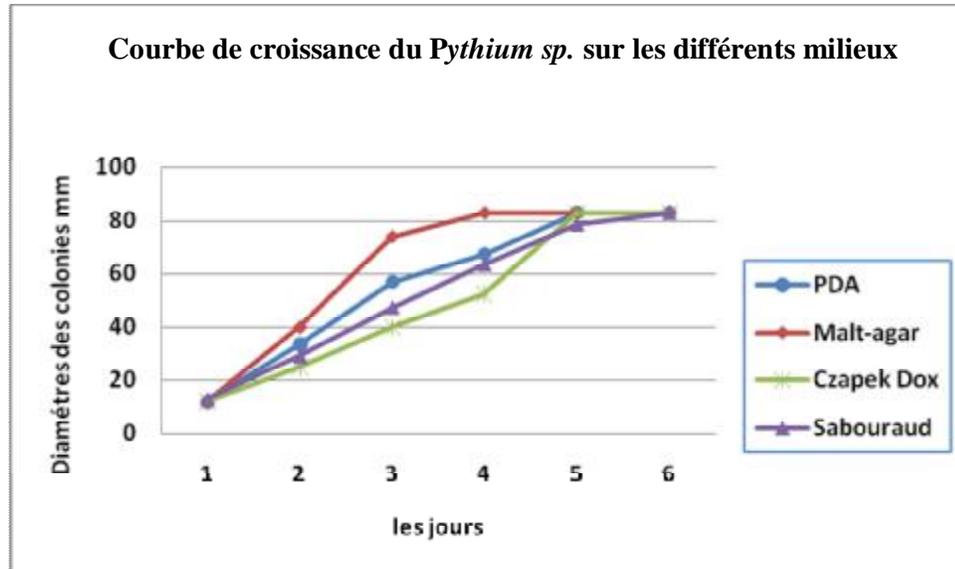
**d- Sur milieu Sabouraud (pH initial 5.5 et température 28°C )**

Dans ce milieu de culture la croissance de colonie se caractérise par une vitesse un peu plus lente que sur les autres milieux ; avec un aspect mycélien filamenteux de couleur blanche.

**Tableau 1** Développement du *Pythium sp.* sur les milieux de culture

Jours / Milieu	1er (24h)	2ième (48h)	3ième (72h)	4ième (96h)	5ième (120h)	6ième (144h)
PDA	12	33.5	57	67.5	83	83
DOX	12	25	40	52.5	83	83
Malt	12	40	74	83	83	83
Sabouraud	13	29	47.5	63.5	78.5	83

ü La croissance mycélienne est exprimée en mm/j.



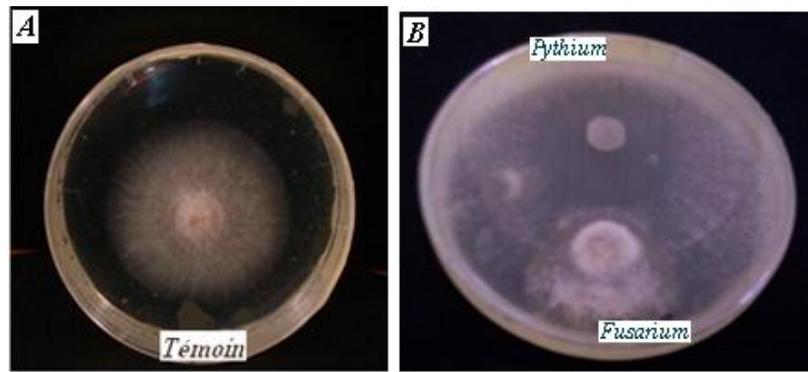
**Figure 18** Courbes de croissance sur les différents milieux (28°C)

## 2. Confrontation directe sur milieu de culture entre *Pythium sp.* et *Fusarium roseum*

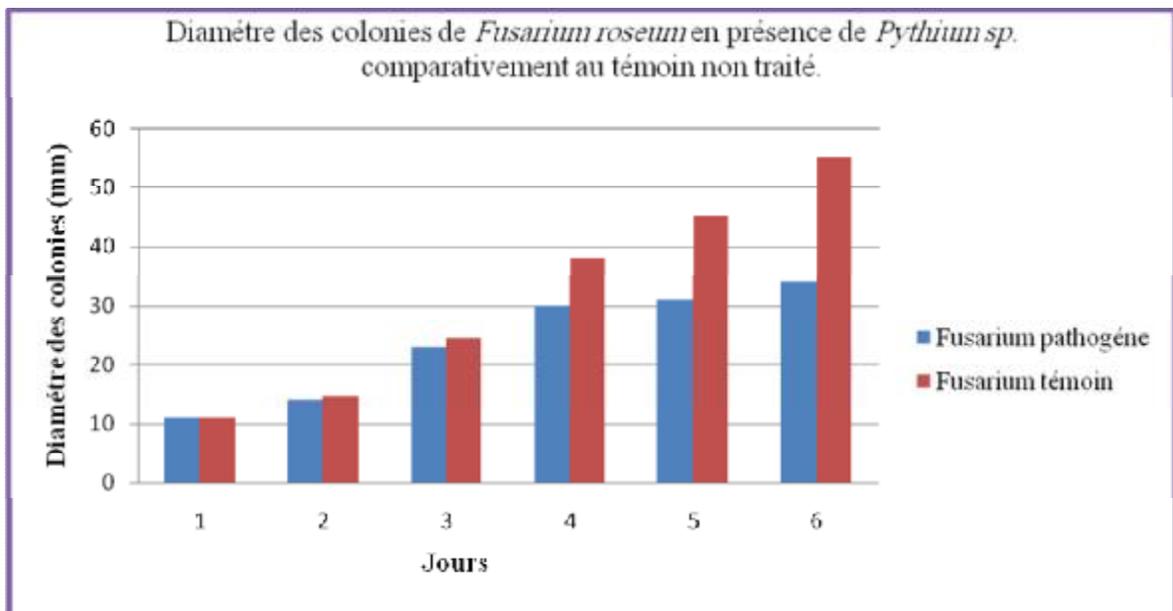
Le repiquage simultané de *Pythium sp.* et *Fusarium roseum* a montré une croissance plus rapide de *Pythium sp.* que le *Fusarium roseum*

Au bout de six jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, qui est le *Pythium sp.*, avec une vitesse de croissance remarquable, il présente un aspect arachnoïde avec un mycélium aérien de couleur blanchâtre

Alors que, *Fusarium roseum*, n'occupe qu'une surface de 31 mm de diamètre ; avec un mycélium plus au moins aérien de couleur rose clair et un taux de croissance faible par rapport à l'antagoniste. Ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 40 %. Le témoin du *Fusarium roseum* cultivé seul occupe une surface d'environ 55 mm de diamètre; avec un mycélium aérien de couleur rose clair, les premiers jours de son développement ; puis prend une couleur rose-vermillon (**Figure 19,20**) (**Tableau2**).



**Figure 19** Effet inhibiteur par confrontation directe du *Pythium sp.* sur la croissance mycélienne du *Fusarium roseum* ; pour une durée d'incubation de six jours à 26 °C



**Figure 20** comparaisant entre le développement mycélien du *Fusarium roseum* traité par confrontation direct avec le *Pythium sp.* et leur témoin.

**Tableau 2:** Confrontation direct entre *Fusarium roseum* et *Pythium sp.* et leur pourcentage d'inhibition exercé .

Jours	Agent Pathogène ( <i>Fusarium roseum</i> )	Agent Antagoniste ( <i>Pythium sp.</i> )	Témoin ( <i>fusarium roseum</i> )	Pourcentage d'inhibition %
1 <sup>er</sup>	11mm	12mm	11mm	0%
2 <sup>ème</sup>	14mm	16.5mm	14.5mm	4%
3 <sup>ème</sup>	23mm	30mm	24.5mm	7%
4 <sup>ème</sup>	30mm	44mm	38mm	22%
5 <sup>ème</sup>	31mm	58.5mm	45mm	32%
6 <sup>ème</sup>	34mm	81.5mm	55mm	40%

Ü Cependant, Daami-Remadi et El Mahjoub (2001) ont signalés que le test d'activité antagoniste de *T. harzianum* vis-à-vis de deux espèces de *Pythium*, que pendant les trois premiers jours la boîte de Pétri est totalement envahie par *Pythium sp.* et que *T. harzianum* ne commence à exercer son activité qu'à partir du 4e jour d'incubation. Ce la confirme que le *Pythium sp.* à une capacité et une vitesse importante à occupé le milieu.

### 3. Confrontation directe sur milieu de culture entre *Pythium sp.* et *Alternaria alternata*

Cette technique (confrontation directe) nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur en direct de *Pythium sp.* exercé sur l'*Alternaria alternata*.

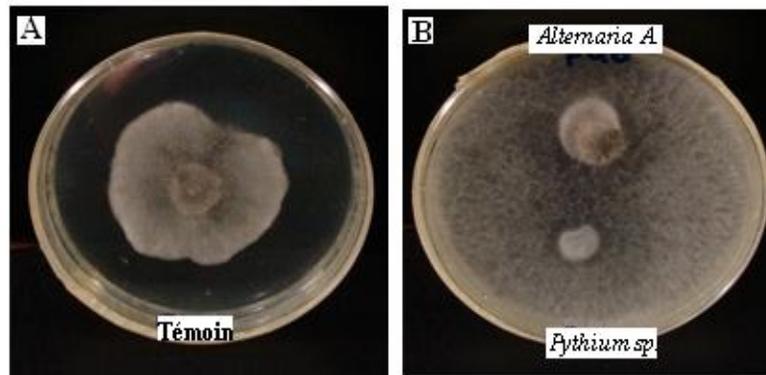
- Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de ce dernier cultivé en présence et en absence de l'antagoniste.

Et grâce à cette technique on a remarqué que la vitesse de croissance du *Pythium sp.* est très grand par apport à l'agent pathogène (*Alternaria alternata*) avec un mycélium aérien de couleur blanchâtre qui envahie tout la boîte au bout de 5 jours aux maximum.

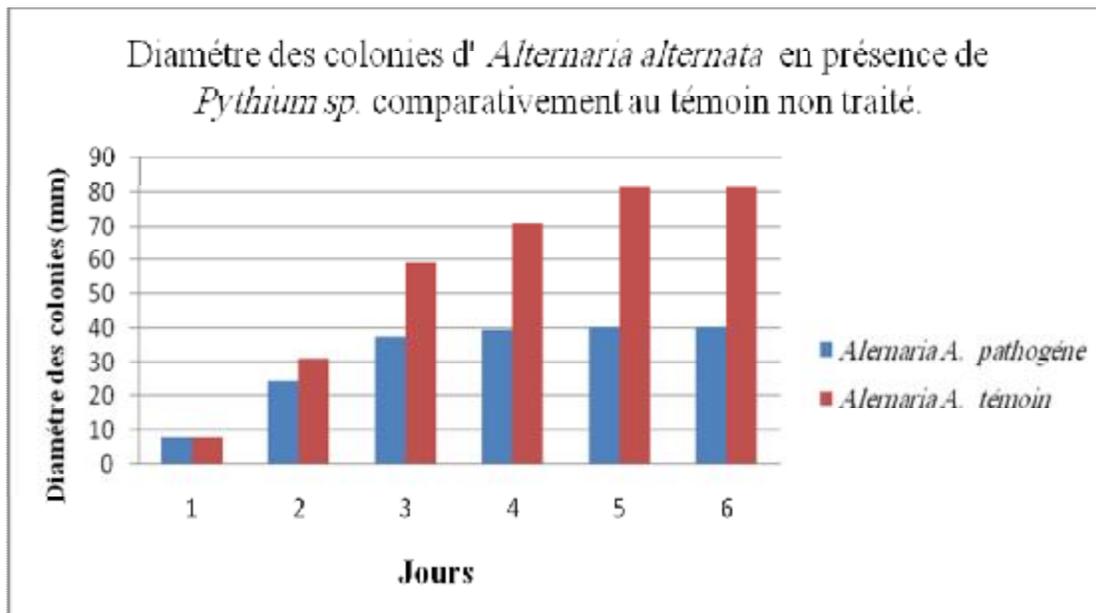
Alors que, *Alternaria alternata* , n'occupent qu'une surface de 40.5 mm de diamètre ; avec un mycélium dense de couleur brin-gris (**Figure 21 B**) et un taux de croissance faible par apport à l'antagoniste .Ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 50%. (**Figure 21**) (**tableau 2**).

Le témoin d'*Alternaria alternata* cultivé seul occupe une surface d'environ 81 mm de diamètre aux bout de 6 jour ; avec une cultures sous forme de colonies grises à noires plutôt veloutées. (Figure 21 A)

ü Donc à l'aide des résultats obtenus du témoin, on peut dire que l'*Alternaria alternata* à eu une vitesse de croissance relativement importante, atteignant son maximum de croissance au bout de 6 jours d'incubation. Mais à la présence d'agent antagoniste (*Pythium sp.*) en remarque que cette vitesse est vraiment diminué avec un pourcentage d'inhibition =50.3%



**Figure 21** Effet inhibiteur par confrontation directe du *Pythium sp.* sur la croissance mycélienne du *Alternaria alternata* ; pour une durée d'incubation de six jours à 26 °C



**Figure 22** comparaisant entre le développement mycélien d'*Alternaria alternata* traité par confrontation direct avec le *Pythium sp.* et leur témoin.

ü Nous avons calculés le pourcentage d'inhibition exercé par le *Pythium sp.* sur le *Alternaria alternata* (tableau3)

**Tableau 3** Représente les résultats obtenus par confrontation direct entre *Alternaria alternata* et *Pythium sp.* et leur pourcentage d'inhibition exercé .

Jours	Agent Pathogène ( <i>Alternaria alternata</i> )	Agent Antagoniste ( <i>Pythium sp.</i> )	Témoin ( <i>Alternaria Alternata</i> )	Pourcentage d'inhibition %
1 <sup>er</sup>	8mm	12.5mm	8mm	0%
2 <sup>ème</sup>	24.5mm	22mm	31 mm	21%
3 <sup>ème</sup>	37.5mm	52.5mm	59.5mm	37%
4 <sup>ème</sup>	39.5mm	74mm	71 mm	44.4%
5 <sup>ème</sup>	40.5mm	81.5mm	81.5mm	50.3%
6 <sup>ème</sup>	40.5mm	81.5mm	81.5mm	50.3%

Ø Ces résultats obtenus montrent qu'in vitro, le *Pythium sp.* réduit significativement la croissance mycélien du *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata* ; et que la sensibilité d'*Alternaria A.* à l'effet inhibiteur du *Pythium sp.* est plus grande que la sensibilité du *Fusarium roseum*. à l'effet inhibiteur du *Pythium sp.*

Ø mais la vitesse d'inhibition du *Pythium sp.* est très grand par rapport aux autre genre de champignons ; comme c'était prouvé par les travaux de Daami-Remadi et El Mahjoub (2001) ; qui ont testé *Trichoderma harzianuma* comme agent de lutte biologique contre quelque espèce de *Fusarium* ; ils ont trouvé qu'il y'a un effet inhibiteur mais avec une vitesse long , par rapport à la vitesse de croissance du *Pythium sp.*

Ø La vitesse de croissance de *Pythium* est importante. Elle se traduit généralement par un envahissement de *Pythium* sur l'agent pathogène , L'envahissement de *Pythium* est généralement direct et intense. Des cas d'enroulement et de pénétration de *Pythium* contre *Rhizoctonia*, les *Alternaria*, *Botryosporium*, *Sclerotinia* et *Cladosporium* ont été observés au microscope optique par Richard,et al., 2006.

Ø La majorité des pertes de rendements agricoles ou sylvicoles est généralement due aux champignons telluriques phytopathogènes dont *Alternaria* et *Fusarium* par exemple, qui une fois établis dans le sol provoque pas mal de dégâts. (Doré *et al.*, 2002)

La protection des végétaux vis-à-vis des champignons pathogènes peut être envisagée par l'application d'autres champignons tels que *Pythium oligandrum* qui a la capacité d'inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes. (Hajlaoui *et al.*, 2001),

Et avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte contre ces champignons phytopathogènes à l'aide de produits biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène (Larkin et Fravel, 1999), c'est pourquoi un test d'activité antagoniste est important.

## V. Conclusion

Cette étude a montré l'effet antagoniste du *Pythium sp.* vis-à-vis du *Fusarium roseum* l'agent responsable de la pourriture des racines et du collet de plante et d'autres maladies de végétaux. Et aussi on a étudié son effet vis-à-vis *Alternaria alternata* qui est l'agent responsable d'alternariose. En effet, les essais de confrontations entre *Fusarium roseum* et *Pythium sp.*, d'une façon directe sur milieu de culture, ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne du pathogène testé. Lorsqu'il y a contact direct entre les deux champignons, *Pythium sp.* envahit les colonies de *Fusarium roseum* avec un pourcentage d'inhibition égale 40% au bout de six jours d'incubation. Dans le cas d'*Alternaria alternata*, malgré sa vitesse de croissance remarquable par la souche non traitée par le *Pythium sp.* On trouve une sensibilité importante pour d'*Alternaria alternata* traitée par le *Pythium sp.* Puisque son pourcentage d'inhibition est supérieur à 50%. La réalisation de ce mini projet a permis d'enrichir nos connaissances en regard le *Pythium sp.* Comme agent de lutte biologique grâce aux résultats obtenus in vitro dans les conditions expérimentales qui confirment que :

- Le *Pythium sp.* réduit significativement la croissance mycélienne du *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata* avec une vitesse de croissance et d'inhibition très grande par rapport aux autres genres des champignons, tel que *Trichoderma harzianum* testé par Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001).
- Alternaria alternata* paraît plus sensible au *Pythium sp.* par rapport aux souches de *Fusarium roseum*.
- le *Pythium sp.* inhibe la croissance mycélienne aux deuxièmes jours d'incubation et augmente jours/jours jusqu'à l'inhibition totale du pathogène.
- les résultats obtenus lors de ce travail sont fort intéressants et mériteraient d'être complétés par une étude in vivo afin de se rapprocher des conditions naturelles ou plusieurs facteurs entrent en jeu tels que :
  - la température ; l'humidité ; et le pH du sol ; qui sont différents de ceux du laboratoire.
  - la présence d'autres microorganismes dans le sol qui interagissent avec les souches expérimentées.

**PERSPECTIVE**

La réalisation de ce mini projet a permis d'enrichir nos connaissances en regardant le *Pythium sp.* comme agent de lutte biologique ; et nous pouvons nous permettre de fixer ces points comme perspectives :

- L'application des tests in vitro accomplir par des tests in vivo
- L'élargissement de la gamme des espèces étudiés afin d'approfondir les résultats et pour arriver à comprendre bien les interactions entre les espèces.
- L'application des tests in vivo ; avec des conditions et des paramètres de développement qui se s'diffèrent qu'in vitro.
- Le renforcement des résultats obtenus par l'application d'un microscope électronique afin de connaître l'effet inhibiteur utilisé pour chaque espèce soit par interaction directe soit par antibiose.

### Summary

Tests of direct confrontation, on culture medium, between *Fusarium roseum* and *Pythium sp.* revealed that he was able to inhibit the mycelia growth of *Fusarium roseum* with a percentage inhibition greater than 40% compared to the control of five days of incubation at 26 ° C. Moreover, and beyond this period and after six days, *Pythium sp.* invaded colonies of *Fusarium roseum* sporulated on what he even shows us his power highly myco-parasite. The results obtained with *Fusarium roseum* are almost similar with *Alternaria alternate*, which is also a pathogen that causes a lot of damage , but we found it more susceptible to *Pythium sp.* With a percentage inhibition greater than 50%. So thanks to in vitro test of *Pythium sp.* Against these two pathogenic aggressive direct contact has been found that can inhibit the mycelia growth with considerable speed and a high level of inhibition.

.  
**Keywords.** *Pythium sp.* , *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*; biocontrol antagonism.

## Résumé

Les essais de confrontation directe, sur milieu de culture, entre *Fusarium roseum* et *Pythium sp.* ont révélé que ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne du *Fusarium roseum* avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 40% par rapport au témoin de cinq jours d'incubation à 26 °C. De plus, et au delà de cette période et au terme de six jours, le *Pythium sp.* envahit les colonies de *Fusarium roseum* sur les quelles il sporule même, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. Les résultats obtenus avec le *Fusarium roseum* sont presque similaire qu'avec l'*Alternaria alternata* qui est aussi un pathogène qui provoque pas mal de dégâts, mais on a trouvé qu'il est plus sensible au *Pythium sp.* Avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%. Donc grâce au test in vitro du *Pythium sp.* Contre ces deux pathogène agressif par contact direct on a trouvé qu'on peut inhiber leur croissance mycélienne avec une vitesse importante et un taux d'inhibition élevé.

**Mots-clés.** *Pythium sp.* ; *Fusarium roseum* ; *Alternaria alternata* ; lutte biologique ; antagonisme.

# Références bibliographiques

Anne Kendall A. (2000). Request Authorship Credit. Article publié sur : [www.mushroomobserver.org/observer/show/1199](http://www.mushroomobserver.org/observer/show/1199)

Azouaoui- Ait Kettout T., Boucenna B., Agoud M., Rahania F. (2007) . article l'ESSAI DE LUTTE *in vitro* PAR LE GLYPHOSATE CONTRE DES CHAMPIGNONS TELLURIQUES PHYTOPATHOGENES : *FUSARIUM* ET *PYTHIUM* ; r Sciences & Technologie . **26** :75-80..

Anonyme 1.( année); Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre. Référence NCBI : *Pythium* (en) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Pythium>

Anonyme 2 . (2007). *Pythium oligandrum* DV 74 (028816) Fact sheet ; Technical Document (PDF); Issued: May 7, 2007. Information related to this page : [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/brad\\_028816.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_028816.pdf)

Anonyme 3.(2001) . Wikipédia, l'encyclopédie libre: *fusarium roseum* ; *effet du fusarium* ; *Fusarium roseum mycotoxines*

Anonyme 4.(année). Principaux champignons allergisants .

André Lévesque C. and WM de Cock A .(2004). "Phylogénie moléculaire et taxonomie du genre *Pythium*". *Mycological Research* **108** (12): 1363-1383. doi:10.1017/S0953756204001431. Récupérée de [«http://en.wikipedia.org/wiki/Pythium»](http://en.wikipedia.org/wiki/Pythium)

Booth, C. 1997. *Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Burgess, L.W., and C.M. Liddell. (1997). *Laboratory manual for Fusarium research*. The University of Sydney, Australia

Benhamou N. and Chet I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* **86**:405–416.

Benhamou N. and Chet I. (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2095–2099.

Benhamou N., Rey P., Cherif M., Hockenull J. and Tirilly Y. (1997). Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* **87**:108–121.

Booth, C. (1997). *Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Bélangier M. R. Ph.D.(2006), phytopathologiste Université Laval, Québec Projet PARDE# 3333.52.02.01 .

Benhamou N. and Chet I. (1996). Parasitism of sclerotia by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* **86**: 405–416.

BASF,the chemical company.( 2008) . Dynamique de propagation de la fusariose (*Fusarium roseum* et *Microdochium nivale*) publié sur internet le 13/11/2008.

Carlier B.(2001). *publication des jeunes agréculteurs* N°557 ;

CRIQUET S. and CALVERT V .( 2008). IMEP UMR CNRS 6116. Planche Tp mycologie publié sur internet le 03/03/2008

Chet L. (1990). *Biological-control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatment .in biological of soil-borne plant pathogens*,ed D.Hornby ,pp15-25.CAB international ,Oxon,England.

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

Deacon J. (2007). *The Microbial World: Pythium oligandrum and other mycoparasites*; Produced by Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh

Domsch K.H., Gams W. and Anderson T.H. (1993). *Compendium of soil Fungi*, volume I & II, IHW - Verlag. Eching.

- De Hoog, G. S., Guarro J., Gene J. and Figueras M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Deshpande S. D., and Koppikar G.V. (1999). A study of mycotic keratitis in Mumbai. *Indian J Pathol Microbiol.* **42**:81-7.
- Davet P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. Paris.383
- Doré T., Le Bail M. and Verger P.(2002). Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. *Cahiers Agricultures*, **11(13)** :177-185.
- Gagné S. (1984). Bactéries telluriques et rhizosphérique inhibitrice de certains champignons phytopathogènes.
- Hajlaoui MR., Hamza N., Gargoussi S., Guermech A. (2001). Apparition en Tunisie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent de la pourriture des racines et du collet de la tomate. *OEPP/EPPO Bull.* **31** : 505-507.
- 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**: 697-705
- Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A. (1997). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie.
- Halonen M., Stern DA. And Wright AL. (1997). *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**:1356-1361.
- Inoue M. (1994). *Fungal contamination of paint film and plastic wall covering*. Ed. Garg KL, Garg N & Mukerji KG, *Recent advances in biodeterioration and biodegradation. Vol 2. Biodeterioration and biodegradation of natural and synthetic products*. Calcutta : Naya PROKASH, 71-80.
- Kwon-Chung, K.J. and Bennett J.E. (1992). *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia and London.

Kapulink y.(1996).*Plant growth promotion by rhizosphère bacteria.In plant Roots,the hidden half*. Eds. Y.Waisel,A.Eshel and U.Kafkafi,pp.769-781.

Larone, D. H. (1995). *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Larkin RP. And Fravel DR. (1999). Mechanisms of action and Dose-Response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of Tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **89**:1152–1161.

Lepoivre Ph.(2003).*phytopathologie* . Ed,Bruxelles.

Laveque C. and Mounolou J.C.(2001).*Biodiversité Dynamique biologique et conservation* .Ed.Dounod 284p.

Lynch J-M. (1990). *Microbial métabolique In the rhizosphère* . Eds.J.M.Lynch pp.177-206.wilay Series in Ecological and applied Microbiology.

Mayayo, E., Pujol I. and Guarro.( 1999). Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J Med Microbiol.* **48**:363-366.

Mathews V. D.( 1931). Studies on the genus *Pythium*. The University of North California press. Baltimore.

MAAARO . (2009). Publication n°811; maladies des céréals; Le personnel du MAAARO.

Nasraoui B.(2006).Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre universitaire Tunis.450.

Paulitz, T.C. et Baker R.( 1997) . Biological control of *Pythium* damping-off of cucumbers with *Pythium nunn*: influence of soil environment and organic amendments. *Phytopathology*, **77**:341-346.

Picard K.(2000). Lutte biologique par *Pythium oligandrum* en cultures hors-sol : dynamique des populations, antagonisme et rôle d'une protéine dans l'induction de résistance chez la tomate. Thèse nouveau doctorat . Université de Brest, Brest, FRANCE [162 p.] (bibl.: 203 ref.)

Pitt, J. I., Hocking A. D. , Bhudhasamai K., Miscamble B. F., Wheeler K. A. and Tanboon-Ek P. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*. **23**:35-43.

Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol*. **38**:17-22.

Raty K .(1994). Biological activities of Actinomycetes and fungi isolated from the indoor air of problem houses. *International biodeterioration and biodegradation* . **34** (2), 143-154

Snyd.et Hansen.(1999).Mycologia . [www.inra.fr/hyp3/pathogene/3fusro2.htm](http://www.inra.fr/hyp3/pathogene/3fusro2.htm)

Sutton, D. A., Fothergill A. W. and Rinaldi M. G. (1998) . Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Schaafsma, A. W., Nicol R. W., Savard M. E., Sinha R. C., Reid L. M., and Rottinghaus G.( 1998) . Analysis of Fusarium toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathologia*. **142**:107-13.

Soufiane B.(1998).Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de Bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Canada, pp56.

Subramanian CV .(1983). Hyphomycetes : Taxonomy and Biology. Academic Press Inc., 300, 357, 399

VAN DER PLAATS-NITERINK A. J. (1991). Monograph of the genus Pythium. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn. Récupéré de :<http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Myco/fiches/pytholig.html>

## ملخص

اختبارات المواجهة المباشرة ، في الوسط الغذائي ، بين *Fusarium roseum* و *Pythium sp.* أظهرت أنها يمكن أن تمنع نمو *Mycobacterium* مع تثبيط نسبة أكبر من 40 ٪ مقارنة مع الوسط الغذائي غير المعرض لفطر *Pythium sp* و ذلك لمدة خمسة أيام من الحضانة تحت حرارة 26 درجة مئوية وبالإضافة إلى ذلك ، وبعد هذه الفترة ، وإلى غاية ستة أيام ، *Pythium sp.* غزت مستعمرات *Fusarium roseum* ليظهر لنا *Pythium sp* قوته العالية (myco الطفيلي) للاستحواد على المستعمرات. النتائج المتحصل عليها مع *Fusarium roseum* متشابهة تقريبا مع *Alternaria alternata* ، الفطر الممرض الذي يسبب الكثير من الضرر ، ولكن وجدنا أنها أكثر عرضة لل *Pythium sp.* مع النسبة المئوية للإعاقة أعلى من 50 ٪. فيواسطة اختبار التضاد المباشر بين فطر *Pythium sp* و *Fusarium roseum* ، *Alternaria alternata* استطعنا أن نثبت أنه يمكن تثبيط نمو هذه الفطريات الضارة بواسطة *Pythium sp* و *F* .

الكلمات الرئيسية: *Pythium sp.* ، *Fusarium roseum* ، *Alternaria alternata* . فطر المكافحة البيولوجية

Nom : **BOUNEGHOU SAMIA BATOUL**

Date de soutenance : 06/07/2010

**L'effet inhibiteur de *Pythium sp.* sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum* et d'*Alternaria alternata***

**Résumé :** Les essais de confrontation directe, sur milieu de culture, entre *Fusarium roseum* et *Pythium sp.* ont révélé que ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne du *F. roseum* de plus de 40% par rapport au témoin et ce après cinq jours d'incubation à 26 °C. De plus, au delà de cette période et au terme de six jours, le *Pythium sp.* envahit les colonies de *F. roseum* sur les quelles il sporule même, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. Des résultats presque similaire ont été obtenus contre *Alternaria alternata* qui est aussi un pathogène qui provoque pas mal de dégâts, mais on a trouvé qu'il est plus sensible au *Pythium sp.* Avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%. Donc grâce au test in vitro du *Pythium sp.* Contre ces deux pathogène agressif par contact direct on a trouvé qu'on peut inhiber leur croissance mycélienne avec une vitesse importante et un taux d'inhibition élevé. .

**Mots-clés.** *Pythium sp.*; *Fusarium roseum*; *Alternaria alternata*; lutte biologique; antagonisme.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie appliquée, Département de Biochimie et de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri de Constantine.

**Jury d'évaluation :**

Président : **KACEM CHAOUCHE. N.**  
Encadreur : **MR. DEHIMAT. L.**  
Co-encadreur : **BOUZIANE. Z.**  
Examineur : **M<sup>me</sup> DJAZAR. I.**  
**M<sup>elle</sup> ABDELAZIZE. W.**

**MC. Univ. Mentouri, Constantine**  
**MC. Univ. Mentouri, Constantine**  
**MC.Uni.Mohamed Seddik Benyahia,Jijel**  
**MC. Univ. Mentouri, Constantine**  
**MC. Univ. Mentouri, Constantine**