



République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique



UNIVERSITÉ DE TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie appliquée à l'Agroalimentaire, aux biomédicales et à l'Environnement : LAMAABE

MÉMOIRE

Présenté par

MEDJADJI Omar El Farouk Ali et TARI Khaled

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

**ÉTUDE DE L'ANTAGONISME IN VITRO DE *PENICILLIUM*
ISOLÉE DES GROTTES VIS-À-VIS DES CHAMPIGNONS
PHYTOPATHOGENES DE LA POMME DE TERRE**

Soutenu le 10/09/2020 devant le jury composé de :

Présidente	Mme Malek Fadila	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme Brahimi-Kholkhal Wahiba	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Bouafia-Amamou Fouzia	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Au terme de cette étude, je tiens d'abord et avant tous de remercier Dieu tout puissant de m'avoir guidé et pour le courage, la patience et la santé qu'il nous a accordés durant toutes ces années d'études en particulier, et de vie en général, pour affronter toutes les difficultés et les obstacles, qui se sont hissés au travers de nos chemins.

Celui qui ne remercie les gens ne remercie guère Dieu.

Un travail de recherche nécessite le concours d'un certain nombre de personnes. Ce mémoire est aujourd'hui l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail.

*Nous tenons à remercier notre cher encadreur **Madame Brahimí Kholkhal Wahíba** (Maître de Conférences Classe B à l'Université de Tlemcen), qui a bien voulu accepter de me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail, pour ses conseils et ses instructions ainsi les bonnes informations. et qu'elles ont mis à notre disposition tous les moyens et les ressources nécessaires à sa réalisation.*

*Je tiens à remercier **Madame MALEK Fadíla** (Maître de conférences A à l'université de Tlemcen) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.*

*Mes remerciements vont aussi à **Mme Bouafia Amamou Fouzia** (Maître de conférences B à l'université de Tlemcen), d'avoir ménagé son*

temps pour juger et critiquer ce travail, qu'elle trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Nous exprimons tout le bonheur du monde à nos collègues de la promotion 2019/2020 du M2 Microbiologie appliquée.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un
profond amour*

A

*Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de
mes études*

A

*Mes chères sœurs ..., pour leurs encouragements
permanents, et leur soutien moral*

A

Mon cher frère ..., pour leur appui et leur encouragement

A

*Toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon
parcours universitaire,*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant
allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,*

Merci d'être toujours là pour moi.

دراسة العداء المختبري للبنسليوم المعزول من الكهوف ضد الفطريات الممرضة للنبات في البطاطس

ملخص

أجريت الدراسة الحالية بهدف السيطرة على نوعين من الفطريات الممرضة للنبات "*Aspergillus Niger*" و "*Fusarium*".

تم عزل هذه الفطريات من درنات البطاطس. تم تحديد الجنس وفقاً للصفات المورفولوجية العيانية. مع أخذ ذلك في الاعتبار، نجحنا أولاً في عزل السلالات الفطرية من بيئة قاسية، وهي كهوف بني عاد، عين فاس بولاية تلمسان في شمال الجزائر. بعد التطور الجيد للمستعمرات، يتم إجراء ثقافات فرعية لكل مستعمرة لتنقيتها، وقد تمت زراعة السلالتين اللتين تم الحصول عليهما على PDA مائل ثم تخزينها عند 4 درجات مئوية لمدة تصل إلى ستة أشهر. ثم نتعرف على السلالتين اللتين تم الحصول عليهما بالميكروسكوب من خلال تحديد أقطار مستعمرات البنسليوم واللون والشكل وإفراز الأصباغ القابلة للانتشار ومعدل نمو المستعمرات، ويتم إجراء هذه الملاحظات بالعين المجردة. في الواقع، يتم التعرف المجهرى على الفطريات عن طريق تلطيخ جزء فطري مأخوذ من اللاكتوفينول، مما يجعل من الممكن اكتشاف وجود وطبيعة الفطريات وكذلك خصائص الأجسام المثمرة. تم توضيح المكافحة البيولوجية لمسببات الأمراض النباتية باستخدام سلالات من جنس البنسليوم من أصل تحت الأرض.

يتم تنفيذ النشاط المضاد لسلالات البنسليوم ضد الفطريات (*Fusarium* و *Aspergillus Niger*) حسب طريقة المواجهة المباشرة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الباحثين العاملين على العداء الفطري أن النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطريات تزيد عن 52٪، والعامل المضاد *Penicillium* يطبق نشاطاً مثبطاً على نمو مستعمرات *Fusarium* و *Aspergillus*. يمكن تفسير ذلك من خلال قدرة العامل المضاد على إنتاج مواد متطايرة (إنزيمات أو مضادات حيوية) قادرة على الحد من تطور العامل الممرض وحتى إيقافه. لذلك سمح لنا هذا البحث المتواضع بتأكيد وتوضيح أهمية القدرة العدائية للبنسليوم فيما يتعلق بسلالات الرشاشيات والفوزاريوم المختبرة.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium* ; *Aspergillus niger* ; *Penicillium* ; المكافحة البيولوجية؛ عداوة؛ المواجهة المباشرة.

Étude de l'antagonisme in vitro de *Penicillium* isolée des Grottes vis-à-vis des champignons phytopathogènes de la pomme de terre

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre deux champignons phytopathogènes "*Aspergillus Niger*" et "*Fusarium*".

Ces champignons ont été isolés à partir des tubercules de pomme de terre. L'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques macroscopiques.

Dans cette optique en premier on est arrivé à isoler des souches fongiques à partir d'un environnement extrême qui sont les grottes de Beni Aad, Ain fezza de la wilaya de Tlemcen au Nord algérien. Après un bon développement des colonies, on effectue des repiquages de chaque colonie pour les purifier, les deux souches obtenues ont été repiquées sur PDA incliné puis les conservés à 4°C pendant une période allant jusqu'à six mois. Puis on va identifier les deux souches obtenues macroscopiquement par la détermination des diamètres des colonies du *Penicillium*, la couleur, la forme, la sécrétion des pigments diffusibles et la vitesse de croissance des colonies, ces observations se font à l'œil nues.

En effet, l'identification microscopique chez les mycètes se fait par la coloration d'un fragment mycélien prélevé par le lactophénole, qui va permettre de détecter la présence et la nature de mycélium et aussi les caractéristiques des fructifications.

La lutte biologique contre ces phytopathogènes est mise en évidence en utilisant des souches du genre *Penicillium* d'origine souterraine.

L'activité antagoniste des souches de *Penicillium* contre les espèces fongiques (*Aspergillus Niger* et *Fusarium*), selon la méthode de confrontation directe. Les résultats obtenus des chercheurs qui travaillent sur l'antagonisme fongique montrent que le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 52 %, l'agent antagoniste *Penicillium* applique une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *Fusarium* et *Aspergillus*. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de l'agent antagoniste à produire des substances volatiles (enzymes ou bien des antibiotiques) qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène.

Alors cette modeste recherche nous a permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel antagoniste de *Penicillium* à l'égard des souches d'*Aspergillus* et *Fusarium* testées

Mots-clés : *Penicillium*; *Aspergillus Niger*; *Fusarium*; lutte biologique ; antagonisme ; confrontation directe

In vitro *Penicillium* antagonism study isolated from caves vis-à-vis fungus potato plant pathogens

Abstract

This study was conducted to control two plants pathogenic fungi "*Aspergillus Niger*" and "*Fusarium*".

These fungi were isolated from potato tubers. The identification of the genus was carried out according to the macroscopic morphological characters.

With this in mind first, we managed to isolate fungal strains from an extreme environment which are the caves of Beni Aad, Ain fezza de la wilaya de Tlemcen in northern Algeria. After a good development of the colonies, transplants are made from each colony to purify them, the two strains obtained were transplanted on sloping PDAs and kept at 4°C for a period of up to six months. Then we will identify the two strains obtained macroscopically by the determination of the diameters of the colonies of *Penicillium*, the colour, the shape, the secretion of the diffusible pigments and the rate of growth of the colonies, these observations are made with the naked eye.

In fact, microscopic identification in fungi is done by staining a mycelial fragment taken by lactophenol, which will detect the presence and nature of mycelium and also the characteristics of fructifications.

Biological control of these plant pathogens is demonstrated using strains of the genus *Penicillium* of underground origin.

The antagonistic activity of *Penicillium* strains against fungal species (*Aspergillus Niger* and *Fusarium*) according to the direct confrontation method. The results obtained from researchers working on fungal antagonism show that the percentage of inhibition of mycelial growth exceeds 52%, *Penicillium* antagonist applies inhibitory activity to the development of *Fusarium* and *Aspergillus* colonies. This could be explained by the ability of the antagonist to produce volatile substances (enzymes or antibiotics) that are able to limit and even stop the development of the pathogen.

So this modest research allowed us to confirm and clarify the importance of the antagonistic potential of *Penicillium* with regard to the strains of *Aspergillus* and *Fusarium* tested.

Keywords: *Penicillium*; *Aspergillus Niger*; *Fusarium*; biological control; antagonism; direct confrontation

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du genre <i>Penicillium</i>	26
Tableau 2 : Les résultats de l'isolement des moisissures	37

Liste des figures

Figure 1 : différentes structures des champignons A : levure unicellulaire B : mycélium pluricellulaire avec hyphe sept C : mycélium pluricellulaire avec hyphe non septé (CAILLAUD ET AL. 2006)	6
Figure 2 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonné (CHABASSE ET AL, 2002).	7
Figure 3 : Les stalactites (König ,2016 ; ANTAKI-MASSON ,2020).	14
Figure 4 : Les stalagmites (KÖNIG, 2016).....	14
Figure 5 : Relation entre organismes, matière organique et roche mère dans le développement du sol (d'après PAUL AND CLARK, 1996).	20
Figure 6 : principaux caractères morphologiques des pénicilliums (TABUC, 2007).....	25
Figure 7 : Cycle de vie de <i>Penicillium spp.</i> (OURARI ET BESSOLTANE, 2017).....	27
Figure 8 : Situation de site de prélèvement (Ghar Beni Aâd) (GOOGLE MAPS).....	30
Figure 9 : Quelques photos des échantillons prélevés (PRISE PERSONNEL).....	30
Figure 10 : Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélose. (HIBAR ET AL, 2005).....	34
Figure 11 : Résultats d'isolement des moisissures (A): E1; (B): E2; (C): E3 (PRISE PERSONNEL)	36
Figure 12 : Aspects macroscopiques des deux des isolats purifiés à partir de sol S1 : Souche 1 ; S2 : Souche 2 (PRISE PERSONNEL).	38
Figure 13 : Tubes de conservation des souches isolées après la purification (PRISE PERSONNEL).	38
Figure 14 : Caractères du thalle de genre <i>Penicillium</i> (BOTTON ET AL. 1990).....	40
Figure 15 : Observation macroscopique de <i>Penicillium chrysogenum</i> (ANGELUCCI ET AL, 1997).....	40
Figure 16 : Observation microscopique des conidiosporés et des hyphes filamenteuses de <i>Penicillium chrysogenum</i> (Gx100) (NOZOWA ET AL, 1970).....	41
Figure 17 : Observation macroscopique des deux champignons phytopathogènes après purification (BAICHE ET DINEDANE , 2020)	42
Figure 18 : Culture après 7 jours sur gélose au malt à 25 ⁰ c et aspect microscopique (G x40) d' <i>Aspergillus Niger</i> (TABUC, 2007).....	43

Figure 19 : Culture après 7 jours sur gélose au malt à 25⁰c et aspect microscopique (Gx40) de *Fusarium oxysporum* (TABUC, 2007).43

Liste des abréviations

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

EPS: Exo polysaccharides

PDA: Potatoes Dextrose Agar

MEA: Malt Extract Agar

Cov19 : Corona Virus 2019

UFC : Unité Formant Colonie

Table des matières

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : Les champignons	4
1 Définition	5
2 Classification	5
2.1 Principe	5
2.2 Classification	5
3 Caractéristiques générales	6
4 Croissance	8
4.1 Croissance apicale	8
4.2 Ramifications.....	8
4.3 Anastomoses.....	8
4.4 Différenciation végétative	8
5 Modes de reproduction.....	9
5.1 La reproduction asexuée	9
5.2 La reproduction sexuée	9
6 Mode de vie	9
6.1 Saprophytes	9
6.2 Parasite	9
6.3 Symbiose	10
7 Les champignons phytopathogènes	10
7.1 Généralités.....	10
7.2 Les principaux genres de champignons phytopathogènes	10

7.2.1	Le genre <i>Fusarium</i>	10
7.2.2	Le genre <i>Aspergillus</i>	11
	Chapitre II : Les grottes	12
1	Définition d'une grotte.....	13
2	Type des grottes.....	13
2.1	Les stalactites tombant	13
2.2	Les stalagmites montant.....	14
3	Microbiologie des grottes.....	14
3.1	Les bactéries	15
3.2	Les actinomycètes.....	15
3.3	Les moisissures.....	15
3.4	Les levures.....	16
3.5	Les algues.....	16
3.6	Les virus	16
	Chapitre III : le sol et les microorganismes	18
1	Le sol.....	19
1.1	Définition	19
1.2	Propriétés physico-chimiques.....	20
1.2.1	Le compartiment solide	20
1.2.2	Le compartiment liquide.....	21
1.2.3	Le compartiment gazeux	21
1.3	Propriétés microbiologiques.....	22
1.4	Les antagonistes.....	22
2	La lutte biologique	22
2.1	Généralités.....	22
2.2	Définitions.....	23
2.3	Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique	23

2.3.1	Antibiose.....	23
2.3.2	Compétition	24
2.3.3	Parasitisme.....	24
3	<i>Penicillium</i>	24
3.1	Généralités et définitions	24
3.2	Morphologie	25
3.3	Taxonomie.....	25
3.4	Reproduction et cycle de vie	26
	Matériels et Méthodes	28
1	Objectif.....	29
2	Isolement et identification de l'agent antagoniste.....	29
2.1	Le site de prélèvement	29
2.2	Echantillonnage	30
2.3	Préparation de milieux de culture.....	31
2.4	Méthode d'isolement	31
2.5	Repiquage et purification	32
2.6	Conservation.....	32
2.6.1	Conservation de courte durée	32
2.6.2	Conservation de longue durée.....	32
2.7	Identification macroscopique et microscopique.....	32
2.7.1	Identification macroscopique.....	32
2.7.2	Identification microscopique	33
3	Test d'antagonisme <i>in Vitro</i>	33
3.1	Les champignons phytopathogène.....	33
3.1.1	Origine des souches (<i>Aspergillus</i> et <i>Fusarium</i>).....	33
3.1.2	Purification	33
3.2	La réalisation du test	33

3.2.1	La confrontation par contact direct	33
3.2.2	Evaluation de la croissance mycélienne	34
3.2.3	Evaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes	34
	Résultats et Interprétations	35
1	Résultats d'isolements du <i>Penicillium</i>	36
1.1	Résultats d'isolement	36
1.2	Le dénombrement	37
2	Purification et conservation	38
3	Identification	39
3.1	Identification macroscopiques	39
3.2	Identification microscopiques	41
4	Test d'antagonisme in vitro	42
4.1	Les souches phytopathogènes	42
4.2	Le test d'antagonisme in vitro	44
4.2.1	La confrontation directe	44
	Discussion	45
	Conclusion et perspectives	48
	Références bibliographiques	50
	Annexes	66

Introduction générale

Tout au long de leur cycle de vie, les plantes et les agents pathogènes interagissent avec une grande variété d'organismes ; ces interactions peuvent affecter la santé des plantes d'une manière positive et/ou négative (**CORBAZ, 1990; NAKKEERAN ET AL, 2005**). On estime que près de 50 % de la production agricole mondiale est perdue avant ou après la récolte.

Les maladies parasitaires des plantes sont causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, protozoaires, les phanérogames parasites, etc...). Ces parasites sont généralement infectieux, car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et sont contagieux, par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine. Les champignons phytopathogènes sont responsables de maladies cryptogamiques et sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (**LEPOIVRE, 2003**).

À l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons telluriques sont rencontrées en Algérie. D'après la (**F.A.O. 1999**), les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique (**AOUAR, 2012**).

Les microorganismes pathogènes sont difficiles à contrôler, car ils peuvent survivre dans le sol pour de longues périodes (**TSCHEN, 1985**). Pour lutter contre ces maladies, l'application illimitée de pesticides dans les sols peut entraîner la pollution de l'environnement et les eaux souterraines et l'apparition de souches pathogènes résistantes. Une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et sont plus respectueuses de l'environnement (**PRAPAGDEE ET AL, 2008**).

CHOUHARY ET COLL. (2009) considèrent que le contrôle biologique des maladies par l'introduction de micro-organismes bénéfiques dans la rhizosphère peut être une solution de rechange ou complémentaire à l'utilisation des produits chimiques de synthèse. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et /ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal.

Plusieurs espèces fongiques d'*Alternaria*, de *Fusarium*... (**THILAGAM ET AL, 2018**) sont des microorganismes ubiquistes affectant les plantes, ces organismes pathogènes sont les plus destructeurs, qui causent des pertes considérables aux cultures (**KANOUNI, 2019**). Selon **OERKE (2005)**, 70% des dommages des cultures agricoles sont d'origine fongique.

Cependant, les champignons phytopathogènes sont devenus incontrôlables suite à leurs résistances aux fongicides chimiques, qui sont à leurs tours néfastes pour l'environnement (pollution des sols ; déséquilibre écologique ...) et pour l'humain. La plupart de ces fongicides dangereux interdits dans les pays développés sont encore utilisés dans les pays en voie de développement dans le monde (UNEP, 2000; VENKATESWARA ET AL, 2007); cela est dû à l'analphabétisme et au manque de sensibilisation chez les agriculteurs de ces pays (VENKATESWARA ET AL, 2007). De ce fait, le choix des microorganismes antagonistes des phytopathogènes est un critère très important. Parmi eux, les champignons sont les meilleurs candidats et spécifiquement le genre *Penicillium*.

En effet, le genre *Penicillium* est un champignon (moisissure) qui se trouve dans le sol et fait partie des ascomycètes. Ce genre présente une grande importance dans les différents milieux industriels tels que le domaine agroalimentaire et pharmaceutique (production de plusieurs drogues). Certaines espèces de ce genre comme *P. chrysogenum* produisent la pénicilline, cette molécule est très utilisée comme un antibiotique pour tuer ou arrêter le développement bactérien chez les êtres humains, les animaux et même les plantes (KIRK ET AL, 2008).

Dans cette optique, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antagoniste *in vitro* des *Penicillium* d'origine souterraine contre des agents phytopathogène « *Fusarium* et *Aspergillus* » isolées des tubercules de pomme de terre.

Le présent travail est subdivisé en deux parties :

- La première présente une recherche bibliographique qui se divise en trois chapitres où inclus les champignons, les grottes, et le sol et les microorganismes.
- La seconde partie expérimentale est constituée du chapitre matériels et méthodes présentant plusieurs étapes telles que : L'isolement des souches fongiques *Penicillium* sp sur des milieux de culture ; la purification et l'identification macroscopique et microscopique des isolats; tests antagonismes de *Penicillium* vis-à-vis les souches d'*Aspergillus* et *Fusarium* par méthode de confrontation directe.
- Le dernier chapitre englobe les différents résultats avec une interprétation, suivi d'une conclusion générale.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les champignons

1 Définition

Les Champignons, encore appelés "Fungi" (du latin) ou mycètes (du grec mukês, champignon), constituent un large groupe diversifié qui possède des caractéristiques communes avec les plantes inférieures et les animaux inférieurs moins évolués, ce sont des organismes nucléés eucaryotes et immobiles (**CHABASSE ET COLL. 1999 ; BLANDEAU, 2012**). Ils représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes. Leur nombre est évalué ce jour à environ 100.000 espèces, mais il est probablement plus élevé (**MUELLER ET SCHMIT, 2007**).

2 Classification

2.1 Principe

Le règne des champignons, ou Fungi comprennent des sous-ensembles appelés divisions ou phylums. Le nom de chaque division se termine par Mycota. Les phylums se divisent en sous-embranchements qu'ils ont un suffixe (Mycotina). Cependant, le nom des classes se termine par - Mycètes, ensuite le suffixe « ale » est utilisé pour désigner les ordres, et celui d' « aceae » pour les familles. Chaque famille renferme le genre et les espèces qui représentent la base de la classification. Ainsi, chaque champignon est identifié par un nom binomial qui débute par le genre et qui se termine par l'espèce (**BOUCHET, 2005 ; CHABASSE, 2008**).

- ❖ Domaine : Eukaryota
- ❖ Règne : Champignon (Fungi)
- ❖ Embranchement (Phylum) : mycota
- ❖ Sous-embranchement : mycotina
- ❖ Classe : mycète
- ❖ Ordre : ales
- ❖ Famille : aceae

2.2 Classification

Les champignons comprennent quatre groupes (phylum) basés sur les différentes formes de la reproduction sexuée : les zygomycota, les ascomycota, les basidiomycota et les chytridiomycota (**EVERT ET AL. 2007**).

- **Les zygomycota** : produisent des zygosporos dans des zygosporanges, sont sans flagelles (**YAJUAN ET AL. 2006**).

- **Les ascomycota** : produisent des ascospores dans des asques.
- **Les basidiomycota** : les basidiospores sont produites sur des basides.
- **Les chytridiomycota** : produisent des cellules mobiles flagellées. Ils sont un groupe principalement aquatique dont c'est le seul groupe de champignons possédant des cellules reproductrices (zoospores et gamète) mobiles (**EVERT ET AL. 2007**).

On outre lorsque la reproduction sexuée est inconnue on parle des champignons imparfaits.

- **Les deuteromycota** : ou champignons anamorphes (= champignons imparfaits = champignons conidiens = champignons mitosporiques) avec un système d'identification particulier essentiellement basé sur le mode de formation des spores asexuées, appelées conidies (**CAILLAUD ET COLL. 2006**).

3 Caractéristiques générales

- Les champignons ce sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaire, dépourvus de chlorophylle, ils sont constitués d'un thalle unicellulaire (comme pour certaines levures) ou pluricellulaire (mycélium) comme la plupart des micromycètes ou des micromycètes (**BENDJAMA ET ALL ; 2014**).

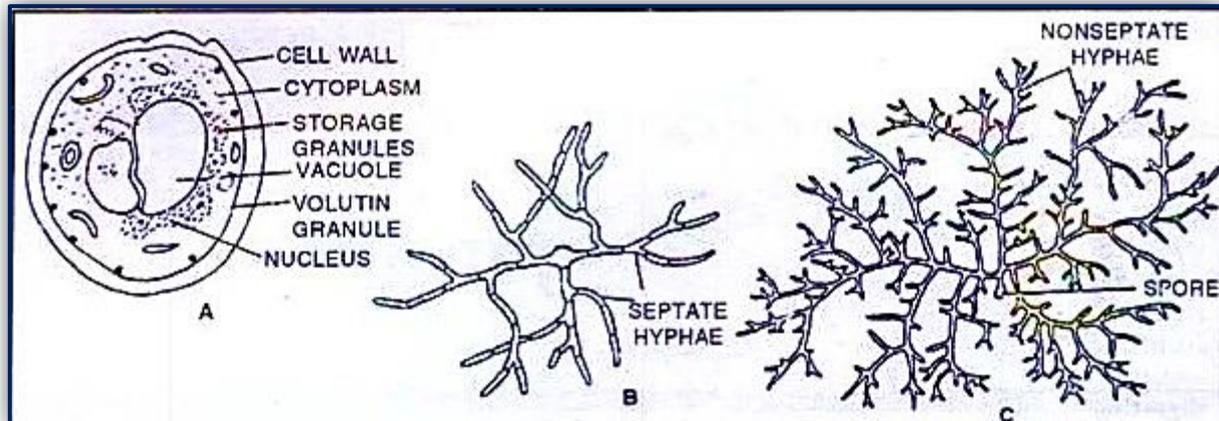


Figure 1 : différentes structures des champignons

A : levure unicellulaire

B : mycélium pluricellulaire avec hyphe sept

C : mycélium plucéllulaire avec hyphe non sept (**CAILLAUD ET AL, 2006**).

- Le thalle des champignons est constitué d'un ensemble de filaments les hyphes souvent assemblés en mycélium ou en stroma (**BENDJEMA.ET ALL, 2011**).

- On distingue plusieurs types de thalles : unicellulaire (mobile ou immobile), filamenteux siphonné ou septé (Figure 2) ainsi que des thalles dissociés bourgeonnants (BENDJEMA.ET ALL, 2011).

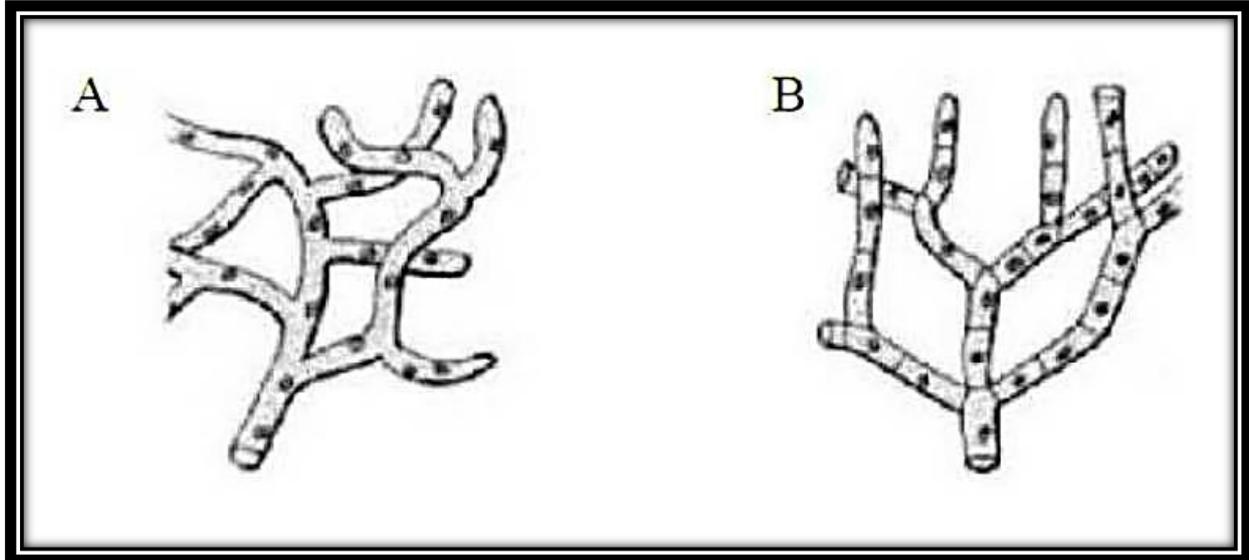


Figure 2 : Structure d'un hyphes et son développement vers la formation d'un mycélium: (A), hyphes coenocytiques ; (B), hyphes cloisonnés (CHABASSE ET AL, 2002).

- Les champignons vivent principalement en saprophyte aux dépens de matières organiques en décomposition. Certains champignons vivent aussi en symbiose avec des espèces appartenant au règne végétal, mais aussi parfois en parasite avec tous les composants du monde vivant. (KACHOUR, 2005).

Selon (TABUC, 2007 ; LE CALVEZ, 2010 ; BLANDEAU ,2012 ; champignons :

- Ils se nourrissent par le mode d'absorption qui sert à libérer des enzymes hydrolytiques en premier temps dans le milieu extérieur.
- Ils se multiplient soit par une reproduction sexuée ou bien asexuée. Les spores produites peuvent avoir un rôle dans la dispersion des champignons, mais peuvent également jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables.
- Ces êtres vivants ne contiennent pas de chlorophylle, le glycogène est le polysaccharide de réserve principal comme pour les animaux, alors que c'est souvent l'amidon dans le cas des plantes. Donc, les champignons n'appartiennent ni au règne animal ni au règne végétal, ce sont donc aujourd'hui dirigés en un règne autonome celui des fungi.

- La plupart des champignons ont une paroi constituée de chitine, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine.
- Ces organismes suivent une voie métabolique énergétique chimiohétérotrophe c'est-à-dire qu'ils utilisent du carbone organique comme source d'énergie.

4 Croissance

4.1 Croissance apicale

Le filament mycélien s'étend au niveau de sa partie juvénile à quelques microns de l'apex présentant une activité généralement assez élevée, étant donné sa richesse en ribosomes et en mitochondries comme agents principaux intervenants dans la synthèse des protéines structurales et des enzymes intervenant dans le métabolisme (**KACHOUR., 2005**).

La membrane des nappes réticulaires présente une continuité structurale avec la membrane cytoplasmique et la régénère au niveau de l'apex par le phénomène d'exocytose (**KACHOUR., 2005**).

4.2 Ramifications

Dans la région subapicale, à quelques dizaines, voire quelques centaines de μm , du dôme terminal et, en présence de ressources nutritionnelles plus que suffisantes (saturation des vésicules apicales), apparaissent de nouvelles formations de "rameaux latéraux" issus de l'axe principal ; elles sont appelées ramifications primaires. Les ramifications secondaires continuent à apparaître, selon le même principe, pour donner au thalle sa texture en réseau. (**KACHOUR., 2005**).

4.3 Anastomoses

Les filaments du réseau mycélien se développent dans tous les sens et s'entremêlent de façon à ce que deux filaments se trouvent croisés ou adjacents, l'un à l'autre, s'adhèrent en quelque sorte, pour former les points d'interconnexion appelés anastomoses. Ces formes-là sont observées aussi bien chez le mycélium végétatif que lors de la fusion cytoplasmique de deux hyphes de sexes différents, au cours de la reproduction sexuée. (**KACHOUR., 2005**).

4.4 Différenciation végétative

Elle dépend, entre autres facteurs, des conditions environnementales et de la nature de la mycète. La différenciation est une série de changements régulés que subit le mycélium

dans le but d'effectuer une fonction déterminée, sans que cela prenne la voie des tissus supérieurs vrais spécialisés physiologiquement et génétiquement pour achever des activités complexes (élaborations hormonales). (KACHOUR, 2005).

5 Modes de reproduction

Chez les champignons la reproduction se divise en deux types :

5.1 La reproduction asexuée

Se font sans fusion des gamètes (LECELLIER, 2013). Elle correspond majoritairement à la formation et la dispersion des spores asexuées, permettant la propagation des moisissures afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction asexuée est appelée la sporulation. (KACHOUR, 2005). Ce type de reproduction est également en cours par d'autres processus qui s'appellent le bourgeonnement, la fission binaire, la fragmentation des spores (LECELLIER, 2013).

5.2 La reproduction sexuée

Ce processus se base sur l'accouplement des deux gamètes haploïdes (n) afin d'obtenir un zygote diploïde ($2n$). (KACHOUR, 2005). Le noyau de cette dernière subit une méiose, ces événements sont suivis par la formation de spores (les ascospores, les basidiospores et les zygosporos). Dont ce processus varie en fonction des classes de champignons (DEACON, 2005).

6 Mode de vie

Quel que soit leur mode de vie, les champignons ont besoin : d'eau, de sel minéral (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^-), d'oligoélément (Fe, Cu...) et d'une source de carbone organique (BOUCHET ET AL, 1989).

6.1 Saprophytes

(Du grec sapos, pourriture et phyton, plante). Ils vivent aux dépens de la matière organique en décomposition. D'une autre façon, Ils participent notamment aux processus de décomposition des matières organiques, d'immobilisation des éléments minéraux et établissent des interactions neutres avec la plante. (KLEIN ET PASCHKE, 2004).

6.2 Parasite

(Du grec parasitos, parasite, de para, à côté et sitos, aliment). Ils vivent aux dépens d'autre être vivant. (VANDER, 2003).

6.3 Symbiose

(Du grec sun, avec et bios, vie). Certains peuvent entrer en relation avec des organismes vivants. Il se forme une association Bénéfique, par exemple les champignons mycorhizes, qui aboutissent des interactions à bénéfiques avec les racines des plantes. (VANDER ET AL. 1998).

7 Les champignons phytopathogènes

7.1 Généralités

Les champignons telluriques phytopathogènes (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes microscopiques hétérotrophes ubiquistes, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées. (KIRK ET AL. 2001). Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes sauvages et cultivées et de causer des dégâts importants. Il s'agit notamment des *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Pythium*, *verticilium*... L'ensemble de ces microorganismes provoquent des maladies sur diverses cultures maraîchères, céréales.... (AGRIOS, 2005).

7.2 Les principaux genres de champignons phytopathogènes

7.2.1 Le genre *Fusarium*

Ce genre inclut des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (NELSON ET COLL. 1983).

Sur le plan économique, le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. Il est considéré parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (BENHAMOU ET AL. 1997).

En outre, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont

susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage. (TABUC, 2007).

7.2.2 Le genre *Aspergillus*

Ce genre est souvent associé aux *Penicillium* et se distingue de ces derniers par l'aspect des conidiosporés qui sont terminés par une tête renflée (CHAMPION, 1997). *Aspergillus* signifie « aspersoir » à cause de la forme de ses têtes aspergillaires (GALINAS, 1995), ce sont des moisissures à filaments cloisonnés hyalins, appartenant à la famille des *Aspergillaceae*, et à la classe des Ascomycètes (A.N.S.E.S, 2012), contaminants très communs, ce genre comprend de 180 à 250 espèces selon les auteurs, dont seules *Aspergillus fumigatus*, *A.flavus*, *A.nidulans*, *A.terreus*, et *A.Niger* sont considérées comme thermotolérantes (REBOUX ET COLL., 2010). Quand les grains sont récoltés humides, insuffisamment séchés ou lorsqu'elles prennent de l'humidité pendant le stockage, les *Aspergillus* peuvent évoluer rapidement et se transformer de saprophytes en parasites et entraînent une baisse importante de la faculté germinative sur les semences (CHAMPION, 1997). De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier. *A. niger* est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol et de la litière, dans le compost et le matériel végétal en décomposition (SCHUSTER ET AL. 2002). Les *Aspergillus* se ramifie et envahit les cellules des tissus ou les espaces intercellulaires. Cette période prend de 24h à 72h selon le niveau de la sensibilité de l'hôte et des conditions climatiques (EZZAHIRI, 2011).Après une période d'incubation, ils se développent et les premiers symptômes apparaissent (BROUILLARD, 2013).Accompagnée de la fructification du champignon, la plante attaquée peut dépérir (nécrose des tissus, détournement de la sève obstruction des vaisseaux).

Chapitre II : Les grottes

1 Définition d'une grotte

Les grottes sont en général des biotopes pauvres en éléments nutritifs avec des températures relativement stables et basses avec des concentrations élevées de minéraux. Par conséquent, les grottes peuvent être considérées comme des environnements extrêmes à vie et fournir des niches écologiques pour des microorganismes hautement spécialisés (**SCHABEREITER-GURTNER ET AL, 2003 ; MARTIN-SANCHEZ ET AL, 2011**). Ils sont souvent limités en ressources en raison de l'absence de lumière qui empêche la production primaire de matière organique par les plantes (**NORTHUP ET KATHLEEN, 2001**).

2 Type des grottes

Les grottes peuvent être classées selon le type de roche qu'elles forment et la façon dont elles sont formées (**PALMER, 1994**). Les types les plus courants de grottes sont ceux formés dans le calcaire. D'autres types de grottes sont généralement limités et comprennent celles du gypse, du granit, du talus, du quartzite, de la glace et du grès. (**KÖNIG, 2016**).

On peut diviser l'environnement intérieur de la grotte en quatre zones principales au regard de la quantité de lumière qui pénètre à l'intérieur :

- La zone d'entrée où la surface et le sous-sol environnements.
- La zone crépusculaire où les rayons lumineux se disparaissent progressivement, dont aucune plante ne peut pousser au-delà de ce point).
- La zone de transition à ce niveau, la lumière disparaît, mais la surface des flux environnementaux tels que la température et l'humidité sont encore détectés).
- La zone profonde où il fait sombre complètement, avec une humidité élevée et une température constante et froide). (**GHOSH ET AL, 2016**).

2.1 Les stalactites tombant

La formation d'une stalactite est évidemment un processus extrêmement long qui demande des milliers d'années. On trouve des stalactites très fines appelées spaghetti (**GHOSH ET AL, 2016**).

Beaucoup de stalactites sont formées d'aragonite, de calcite, de dolomite, de gypse et d'aiguilles Mg-Si ainsi qu'un biotope microbien diversifié et des exo polysaccharides (EPS) qui sont minéralisés à des degrés divers (**BRIAN, 2010**).

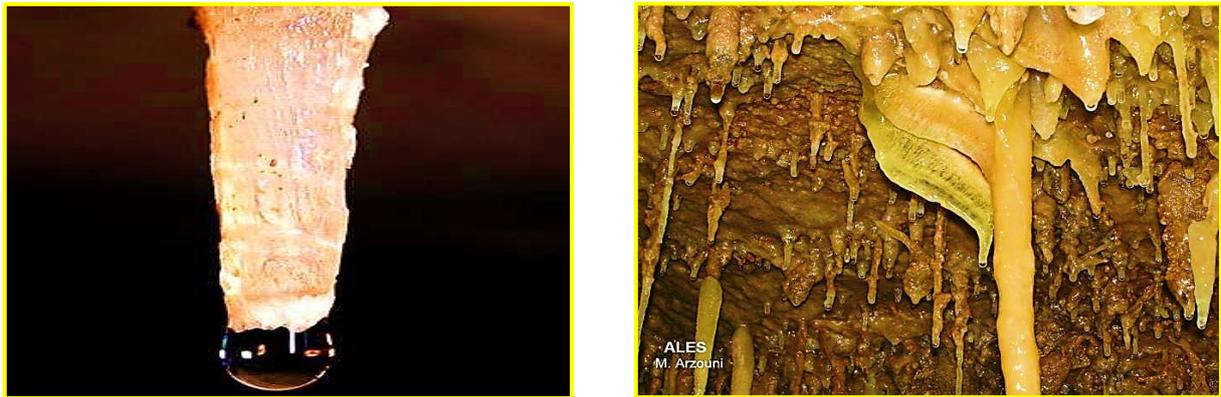


Figure 3 : Les stalactites (KÖNIG ,2016 ; ANTAKI-MASSON ,2020).

2.2 Les stalagmites montant

Contrairement aux stalactites, les stalagmites se forment depuis le sol par l'accumulation d'eau calcaire tombant goutte à goutte d'une stalactite (Figure 4). Ainsi, une stalagmite est toujours couplée à une stalactite.

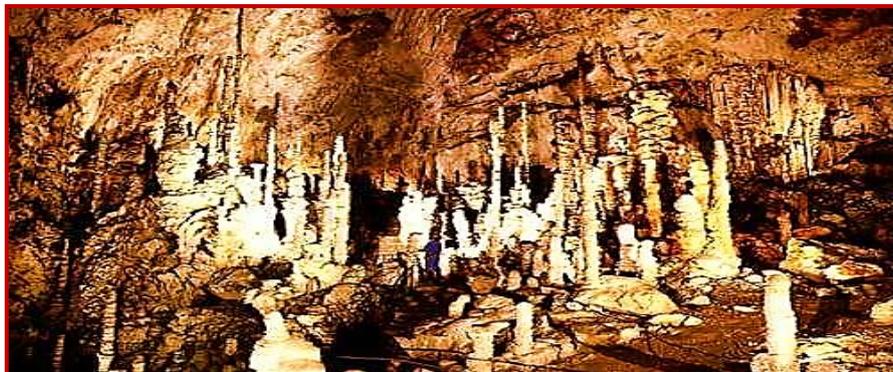


Figure 4 : Les stalagmites (KÖNIG, 2016).

Quand les structures se touchent, on obtient une colonne de diamètre plus ou moins impressionnant. Si l'écoulement se fait par une fente « en long » on obtient des draperies plus ou moins fines et transparentes selon les cas et de couleurs différentes suivant les impuretés (l'ocre, le rose et le rouge sont souvent les couleurs du fer) (KÖNIG, 2016).

3 Microbiologie des grottes

Les microorganismes sont présents dans tous les habitats de la biosphère, y compris dans les habitats souterrains. Ces habitats souterrains sont caractérisés par l'absence de lumière, une quantité limitée voire l'absence de nutriments organiques, une température relativement

constante et une grande surface de minéraux. Comme, les grottes sont l'un des habitats souterrains, il y a une diversité microbienne : on trouve les protozoaires, les algues microscopiques, les champignons, les bactéries, les actinomycètes, plus les virus (**WILD, 1993; MAIER ET AL, 2000**).

Par ailleurs, les communautés microbiennes présentes dans différentes grottes sont le reflet des caractéristiques de chaque écosystème dans lequel les substrats, les niveaux de matière organique et les conditions climatiques sont différents (**ALABOUVETTE ET SAIZ-JIMENEZ, 2011**).

3.1 Les bactéries

Les microorganismes les plus abondants dans les grottes sont les bactéries, ce sont surtout les chimios-autotrophes (**PECK, 1986**).

Les bactéries aérobies sont les plus nombreux du sol, participent essentiellement à d'oxydation de la matière organique par contre les anaérobies assurent les réactions de réduction au cours de fermentations (**VITOUSEK, 1991**). Les espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* sont les plus isolés (**SOMAVILLA ET AL, 1978**).

Plus, la plupart des bactéries cultivables des eaux souterraines sont les hétérotrophes Gram-négatifs (**YUN ET AL, 2015**).

3.2 Les actinomycètes

De nombreux travaux ont rapporté la dominance des actinomycètes en milieux souterrains (**GROTH ET SAIZ-JIMENEZ, 1999; CHEEPHAM ET AL, 2013; TOMCZYK-ZAK ET ZIELENKIEWICZ, 2016; GHOSH ET AL, 2017**).

3.3 Les moisissures

Les champignons ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus*. On les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes. (**FLORENT, 1993, ET TACHENO, 1999**).

D'ailleurs, beaucoup de champignons qui peuvent être cultivés dans des grottes peuvent ne pas croître dans l'environnement des grottes, mais sont présents régulièrement ou rarement comme des spores, transportés par l'eau, les courants d'air ou les animaux (**VANDERWOLF ET AL, 2013**).

Grande diversité d'espèces de champignons est trouvée dans le sol à l'extérieur des grottes par rapport à l'intérieur (**DICKSON ET KIRK, 1976, VOLZ ET YAO, 1991 ; HSU ET AGORAMOORTHY, 2001**).

Plus de 1150 d'espèces dans 550 genres ont été découverts dans les grottes et les mines, dont 20 nouvelles espèces. Certaines espèces comme *Acaulium caviariforme*, *Aspergillus baeticus*, et *Aspergillus thesauricus* ont été suspects d'être des TROGLOBIES (**VANDERWOLF ET AL, 2013; ZHANG ET AL, 2017**).

Plus, la diversité des genres fongiques filamenteux dans l'air augmente de l'extérieur vers le plus profond dans les grottes à titre exemple le genre : *Aspergillus* et *Penicillium* sont plus abondantes dans les sédiments d'entrée par rapport à l'intérieur ; tandis que d'autres genres étaient plus répandus à l'intérieur de la grotte (*Absidia, Rhizopus, Mucor, Chaetomium, Sepedonium*) (**POHL ET AL, 2007**).

3.4 Les levures

L'étude de ces microorganismes pour mettre en évidence leur rôle dans la formation des taches noires de la grotte de Lascaux a prouvé que ces levures dites noires sont un groupe de champignons assez hétérogène. Elles peuvent coloniser des environnements extrêmes caractérisés par des conditions oligotrophes, des températures basses, des radiations UV, des stress osmotiques et des combinaisons de ces différentes conditions environnementales de la grotte (**VANDERWOLF ET AL, 2013**).

3.5 Les algues

Les algues microscopiques sont des organismes ubiquistes, unicellulaires, groupés en colonies ou filamenteux (**SOUCHIER ET AL, 1994**) qui a colonisé des parties des sols, des murs et des stalactites de la grotte (**BORDERIE ET AL, 2014**). Les principales activités attribuées au micro algues dans le sol sont la fixation du CO₂, la fixation biologique de l'azote et la consolidation des surfaces (**SOUCHIER ET AL, 1994**). Les algues vertes *chlorophyta* se caractérisent par un embranchement excrément varié dont elles se développent dans le sol (**PRESCOTT ET AL, 2003**).

3.6 Les virus

Les grottes manquent généralement d'une diversité virale. La présence des virus dans ces milieux souterrains responsable des maladies telle que la fièvre hémorragique de Marburg causé par un virus isolé à partir des chauves-souris africain. Aucune étude n'a encore été réalisée

sur la diversité virale en utilisant des échantillons d'eau, de sol ou de sédiments provenant des grottes (GHOSH ET AL, 2016).

D'après (SHI ZENG-LI ET AL, 2017). Ces chercheurs ont découvert que la raison de l'apparition de la pandémie de Coronavirus chez l'homme est le résultat d'une infection transmise des chauves-souris d'une grotte à l'homme, car ils ont trouvé une grande similitude dans le génome des deux parties de 96%. Qui a beaucoup évolué à ce jour.

*Chapitre III : le sol et les
microorganismes*

1 Le sol

1.1 Définition

L'entité sol peut avoir de nombreuses définitions qui dépendent généralement de la discipline d'étude.

Le sol est une entité naturelle, c'est-à-dire dont l'existence initiale ne dépend pas de l'homme, superficielle et souvent meuble résultant de la transformation, au contact de l'atmosphère et des êtres vivants (biosphère), d'un matériau minéral (géosphère) issu le plus souvent d'une roche sous-jacente, sous l'influence des processus physiques, chimiques et biologiques (**BAIZE AND GIRARD, 1995 ; GIRARD ET AL, 2004**).

Le sol est la couche supérieure de la croûte terrestre, composée de matière minérale, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Il dispose de son atmosphère interne, ainsi que d'une flore et d'une faune spécifiques. Les sols proviennent de l'altération et de la transformation des roches sous l'action de la vie, de l'atmosphère et des échanges d'énergie qui s'y manifestent (**BARLES ET AL, 1999**). Ce sont des systèmes dynamiques complexes qui évoluent en permanence sous l'action de processus pédogénétiques relativement lents, bien que certains événements ponctuels puissent accélérer leur évolution (par exemple érosion rapide et importante dans le cas d'un événement climatique violent), et peuvent se dégrader (**DUCHAUFOR, 1997 ; GROSBELLET, 2008**).

Selon (**MAC CARTHY ET AL, 1990 ; QUENEA, 2004**). Le sol est un système complexe constitué de différentes matières premières interagissant les unes avec les autres (Figure 5). La pédogenèse résulte de l'altération d'un substrat minéral par des phénomènes physiques, chimiques et biologiques. Au cours de cette transformation, le substrat minéral est colonisé par des organismes qui composent peu à peu la matière organique. Cette matière organique s'associera ainsi au minéral pour former entre autres des complexes organominéraux. Les propriétés du sol résultent de l'effet de toutes ces interactions.

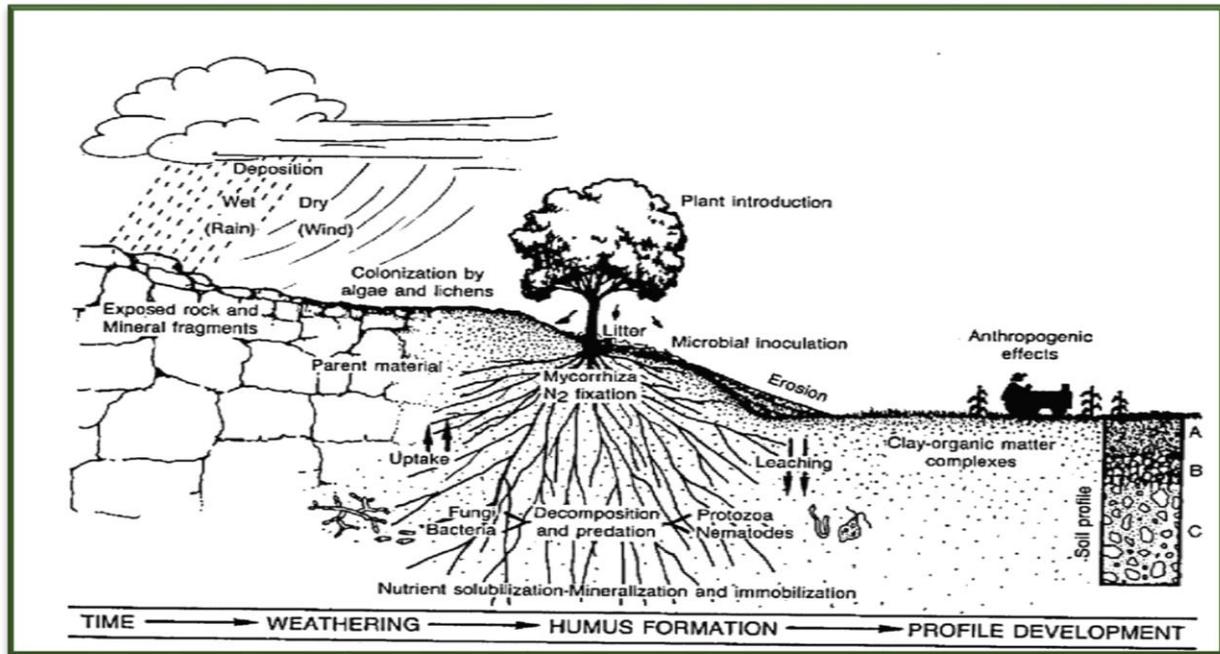


Figure 5 : Relation entre organismes, matière organique et roche mère dans le développement du sol (d'après Paul and Clark, 1996)

1.2 Propriétés physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques d'un sol sont estimés comme des marqueurs de la qualité physique et chimique des sols (TESSIER, 1999 ; DEBEYSER, 2003 ; RAHOU ET AL, 2001). Par ailleurs le sol est considéré comme un système hétérogène, poreux et polyphasique constitué de trois compartiments : solide, liquide et gazeuse. Aux interfaces entre ces différentes phases, d'importants phénomènes de rétention d'eau et de substances chimiques, des échanges d'ions et de molécules peuvent avoir lieu (HILLEL, 1982 ; SCHWARTZ, 2011).

1.2.1 Le compartiment solide

Le compartiment solide du sol est en général majoritairement minéral (90 à 99% de la masse du sol), mais comprend toujours une fraction organique dont le taux varie selon le type de sol et les conditions de pédogenèse. Les sols cultivés présentent des taux de matière organique compris dans une gamme allant de moins de 1% à 20% de la masse du sol (CALVET, 2003).

1.2.2 Le compartiment liquide

La phase liquide du sol est souvent désignée par le terme « solution du sol ». Cette dernière, occupant une partie plus ou moins importante de la porosité du sol, est constituée d'eau où se trouvent diverses substances organiques et minérales dissoutes et des particules en suspension. La composition de la solution du sol varie selon celle du sol, mais également en fonction du climat, des apports anthropiques (fertilisants, produits de traitement phytosanitaire...) et de l'activité biologique du sol (exsudats racinaires, produits de synthèse et de dégradation microbienne ...).

La solution du sol joue un rôle important dans la nutrition végétale, car les plantes y puisent les éléments nutritifs présents sous des formes solubles dites « assimilables » ou « biodisponibles ». Cette notion de biodisponibilité concerne également de nombreux xénobiotiques (pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques ...). Leur présence dans la solution du sol les rend accessibles aux microorganismes et aux plantes.

Une dynamique d'échange existe en permanence entre les ions ou molécules retenus par la phase solide du sol et ceux présents dans la solution du sol. **(EL ARFAOUI BENAOMAR, 2010).**

1.2.3 Le compartiment gazeux

Dans les sols, les gaz occupent 15 à 35% du volume total. Dans un sol bien aéré, les gaz qui règnent dans l'atmosphère du sol sont l'azote (78 à 80%), l'oxygène (18 à 20%) et le dioxyde de carbone (0,2 à 3%). Quoique faible, la quantité de gaz carboniques présente dans le sol est nettement supérieure à celle présente dans l'air atmosphérique (0,03%). Ceci est dû à la respiration des organismes vivants du sol et à la minéralisation de la matière organique.

D'autres molécules gazeuses d'origine anthropique telles que les pesticides ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques peuvent également être détectées dans l'atmosphère du sol.

Ces gaz peuvent exister dans le sol soit à l'état libre soit dissous dans la solution du sol. Cependant, dans certaines conditions (d'hydromorphe par exemple), la phase gazeuse peut être absente ; tout l'espace poral du sol est alors occupé par l'eau et le sol est dit saturé **(DUCHAUFOR, 1984 ; ROBERT, 1996 ; CALVET, 2003).**

1.3 Propriétés microbiologiques

Le sol est un milieu propice à la vie, y compris les microorganismes qui existent en très grand nombre (DAVET, 1996) formant des populations de différents genres. La distribution et l'activité de ces organismes vivants dépendent de plusieurs facteurs, parmi eux : la région idéale pour la croissance de chaque microorganisme, le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, l'humidité, la température, le pH, l'aération... etc. (RUARK ET ZARNOCH, 1992 ; MADIGAN ET AL, 1997 ; SUBLER ET KIRSCH, 1998 ; PEUK, 2000 ; SMITH ET AL, 2000 ; KATTERER ET ANDOREN, 2001).

Les bactéries (environ 500 kg par hectare) et les champignons (environ 1500 kg par hectare) (BERTRAND ET DE HALLEUX, 2005). Ces deux microorganismes sont les plus dominants dans les sols, ils jouent un rôle prépondérant dans la minéralisation des matières organiques (QUENEA, 2004). Ils participent aussi à un processus appelé humification qui conduit à la formation de l'humus (PAUL ET CLARK, 1996) qui est un composé complexe et majeur du cycle de la matière organique tellurique et de la fertilité du sol. Au-delà de ça, ces microorganismes influencent sur la santé des plantes, de façon négative dans le cas des agents phytopathogènes ; ou positive dans le cas des populations bénéfiques en réduisant la croissance et l'activité des pathogènes (antagonisme microbien) et en stimulant les réactions de défense des plantes (DUCHAUFOR, 2001).

1.4 Les antagonistes

Les organismes antagonistes sont à la base de l'apparition du phénomène de lutte biologique. Les effets d'antagonistes sont médiats ou immédiats et peuvent être dus aux organismes introduits ou à la manipulation des organismes existants (NASRAOUI, 2006).

Les agents de lutte biologique peuvent être de plusieurs types : des virus (*Cydia pomonella*, *Pandemis heparana*...), des bactéries (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*...) et des champignons (*Metarhizium anisopliae*, *Coniothyrium minitans*...). (ALMI, 2016).

2 La lutte biologique

2.1 Généralités

Le milieu agricole et le milieu forestier sont l'objet depuis plusieurs années de critiques concernant leur impact environnemental. Les citoyens s'inquiètent de la dégradation des milieux naturels ainsi que de l'innocuité des aliments qu'ils consomment. Cette perception négative a été exacerbée en Europe suite aux crises successives qui ont frappé le milieu agricole

(contamination de poulets à la dioxine, crise de la vache folle, épidémie de fièvre aphteuse). Face à ces critiques et afin de rendre moins polluante et moins risquée l'agriculture moderne, un certain nombre de solutions, dont la lutte biologique, sont proposées (**BOIVIN, 2001**).

2.2 Définitions

Dans le domaine agronomique, on entend par la lutte biologique toute forme d'utilisation d'organismes vivants ayant pour but de limiter la pullulation et /ou la nocivité des divers ennemis des cultures. Rongeurs, insectes et acariens, nématodes, agent des maladies des plantes et mauvaises herbes sont justiciables d'une telle lutte, qui sont basés sur des relations naturelles entre individus ou entre espèces, mises à profit par l'homme de diverses manières. L'organisme vivant utilisé comme agent de lutte est un « auxiliaire » de l'homme (**GRISON 1991**).

Une autre définition générale telle celle proposée par Van Drische et Bellows, (1996): « La lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénicité ou compétition ».

La lutte biologique c'est toutes les formes non chimiques de contrôle des ravageurs des récoltes, mais aussi de mauvaises herbes (**KOUASSI, 2001**).

2.3 Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, oxygène, espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (**JJKLI, 2003**).

2.3.1 Antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire.

L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (JIJAKLI, 2003). Elle consiste à la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (CORBAZ, 1990).

2.3.2 Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante (JIJAKLI, 2003).

2.3.3 Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (HELLUY ET HOLMES, 2005).

3 Penicillium

3.1 Généralités et définitions

Le genre *Penicillium* est un champignon (ou moisissure) qui fait partie des ascomycètes. Ce genre présente une grande importance dans le milieu naturel ainsi que dans la production de plusieurs drogues. Certaines espèces de ce genre produisent la pénicilline (HARJUNPAA, 1996). La majorité d'espèces de ce genre est capable de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*) ; l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*) ; la citrinine (*Penicillium expansum*) ; l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (PITT, 2002).

Les *Penicillium*s sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, pouvant être responsables de nombreuses dégradations (BOTTON ET AL, 1990). Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost. Il est très répandu dans les régions à climat tempéré. Certaines espèces de *Penicillium* contaminent les céréales et les grains avant la récolte. (PITT ET HOKING, 1997).

Le genre a été d'abord décrit dans la littérature scientifique par Johann Heinrich Friedrich Link dans son ouvrage observations dans les plantarum ordines naturelles en 1809.

3.2 Morphologie

Les penicilliums se distinguent par leur organisation en pinceau (Figure 6). Le thalle, formé de filaments mycéliens septés hyalins, porte des conidiosporés lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiosporés peuvent être isolés, groupés, en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (ANANI ET BENTALEB, 2016).

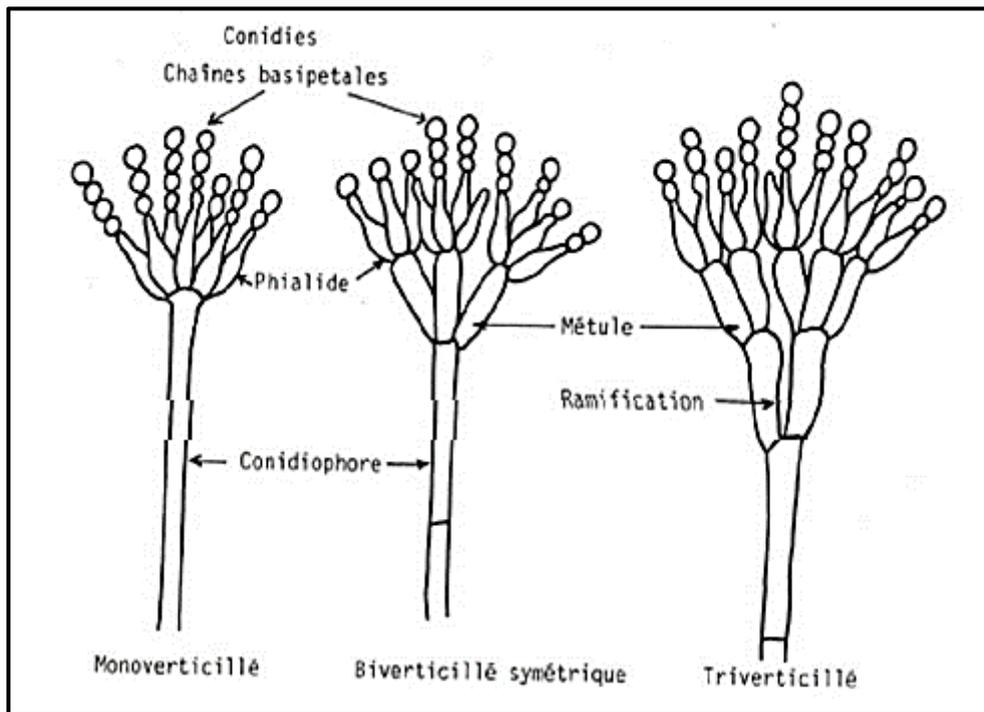


Figure 6 : principaux caractères morphologiques des pénicilliums

(TABUC, 2007).

3.3 Taxonomie

Le genre *Penicillium* contient environ 300 espèces (SAMSON ET PITT, 1985), qui sont classées dans le taxon suivant (tableau):

Tableau 1 : Classification du genre *Penicillium*

Cette classification a été d'abord décrite dans la littérature scientifique par Johann Heinrich Friedrich Link dans son ouvrage observations dans les plantarum ordinés naturels en **1809**

<i>Règne</i>	<i>Mycetea (Fungi)</i>
<i>Division</i>	<i>Amastigomycota</i>
<i>Sous-division</i>	<i>Ascomycotina</i>
<i>Classe</i>	<i>Ascomycetes</i>
<i>Sous-classe</i>	<i>Plectomycetidae</i>
<i>Ordre</i>	<i>Eurotiales</i>
<i>Famille</i>	<i>Eurotiaceae</i> <i>(Trichocomaceae)</i>
<i>Genre</i>	<i>Penicillium</i>

Cependant, d'autres auteurs situent ce genre dans la classe des Deutéromycetes ou champignons imparfaits (**BOTTON ET AL. 1985**).

3.4 Reproduction et cycle de vie

Bien que de nombreux eucaryotes puissent se reproduire sexuellement, environ 20% des espèces fongiques présentent un mode de reproduction asexuée. Toutefois, la capacité sexuelle

des champignons a récemment été déterminée pour l'espèce *P. roqueforti* sur la preuve des gènes de types d'accouplement fonctionnels impliqués dans la compatibilité sexuelle fongique. La présence de la plupart des gènes importants dans le génome séquencé connu pour être impliqué dans la méiose, le *Penicillium chrysogenum* couvre une importance médicale majeure, car il présente une source industrielle importante de l'antibiotique pénicilline. Le mode de reproduction de cette espèce a été considéré comme asexué pendant plus de 100 ans, malgré les efforts fournis pour induire la reproduction sexuée. Enfin, une reproduction sexuée démontrée chez certaines espèces telles que *P. chrysogenum*, *Penicillium marneffei* était également supposé de se reproduire de façon asexuée, cette hypothèse a reposé en grande partie sur la structure hautement clonage des espèces (OURARI ET BESSOLTANE, 2017).

Cependant, le cycle de vie du *Penicillium* se multiplie de manière végétative (conidiogénèse) en produisant sur les parties aériennes des conidiospores qui sont des spores non sexuées (conidies) et constituent, chez la plupart des espèces, un thalle vert. Les critères morphologiques utilisés en taxonomie reposent sur les aspects et les modalités de branchement des conidiospores et des conidies. La propagation des conidies, produites en chaînes à partir de cellules appelées phialides est réalisée dans l'atmosphère ambiante. Dans des conditions favorables d'humidité et de température, les conidies gonflent et émettent des tubes germinatifs et ensuite du mycélium visible (Figure 7) (OURARI ET BESSOLTANE, 2017).

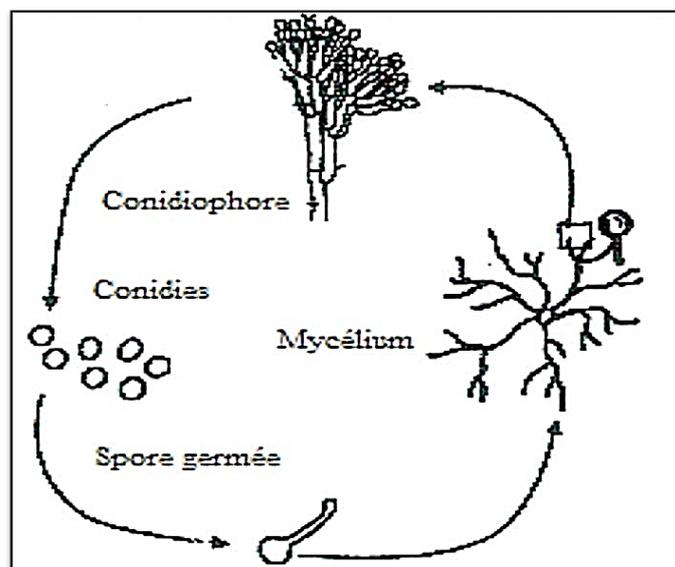


Figure 7 : Cycle de vie de *Penicillium* spp.
(OURARI ET BESSOLTANE, 2017).

Matériels et Méthodes

1 Objectif

Ce travail consiste à isoler, purifier et identifier des souches fongiques à partir d'un biotope extrême qui sont les grottes de Beni AAD, et aussi dans cette étude on va mettre en évidence l'activité antagoniste *in vitro* des *Penicilliums* d'origine souterraine contre des agents phytopathogènes « *Fusarium* et *Aspergillus* » isolées des tubercules de pomme de terre.

2 Isolement et identification de l'agent antagoniste

2.1 Le site de prélèvement

Le village Ain Fezza, le lieu de nos prélèvements, se situe A 12 km de l'est du centre-ville de Tlemcen, d'altitude 860 m par rapport au niveau de mer. Son ancien nom Ifri désigne sa nature montagneuse et qui englobe plusieurs grottes et cours d'eau.

Dans notre travail on a choisi « **Ghar Beni Aad** » : qui est la plus grande grotte visitable en monde, elle est caractérisée par une longueur de 700 m, et une profondeur qui dépasse 18 m, situés de 7 km du Sud-est du chef-lieu de la commune d'Ain Fezza.

Cette grotte s'insère dans un relief montagneux chahuté avec un affleurement rocheux très net. De l'intérieur, c'est une importante cavité creusée dans la roche calcaire du massif de Tlemcen et qui s'incruste dans un ensemble de jurassiques supérieurs (dolomie) donnant ainsi une gamme de formes karstiques.

Elle existe depuis 65000 ans, elle a été découverte par les Berbères une ou deux années avant Jésus Christ. Pendant la guerre de libération algérienne, elle a servi comme un refuge des combattants qui accédaient non pas par l'ouverture principale, mais par une faille qui fut bombardée par la suite. Durant les années 70, elle était l'attraction principale des touristes ou la fréquentation a atteint 4500 v/an en 1971 (**PARC NATIONAL DE TLEMCCEN, 2006**)

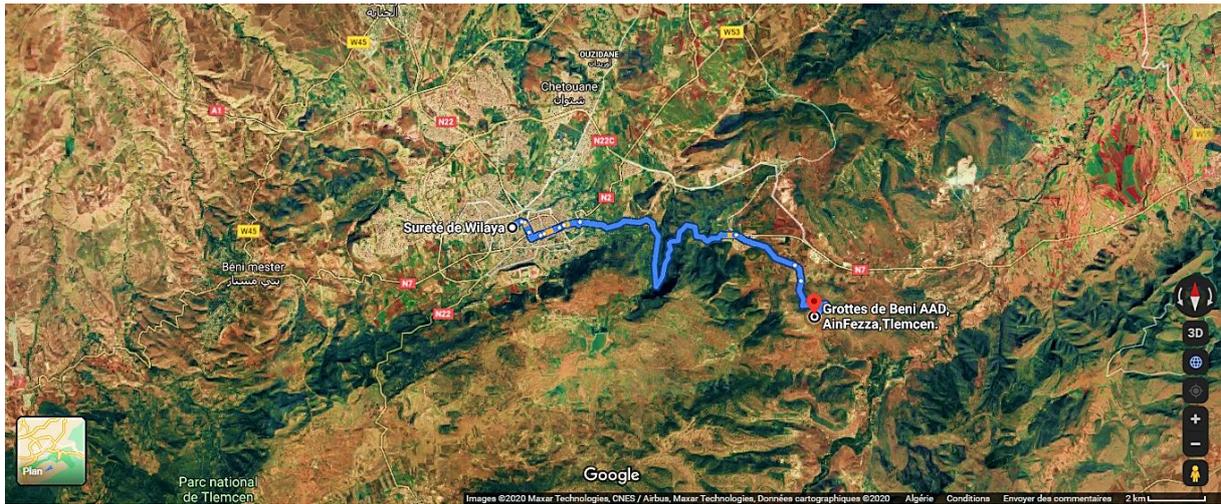


Figure 8 : Situation de site de prélèvement (Ghar Beni Aâd) (GOOGLE MAPS).

2.2 Échantillonnage



Figure 9 : Quelques photos des échantillons prélevés (PRISE PERSONNEL).

Les échantillons du sol sont prélevés à partir de grotte de Ghar Beni Aâd (Figure 9) pendant le mois de février 2020, de manière aléatoire et simple.

Les prélèvements sont faits à l'aide d'une spatule et placés dans un flacon stérile et transporté au laboratoire dans des conditions d'asepsie rigoureuse, selon le protocole décrit par **(POCHON ET TARDIEUX ,1962)**.

2.3 Préparation de milieux de culture

Afin de réaliser l'isolement de la microflore de nos échantillons, on a utilisé deux milieux de culture, le premier c'est le milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar). Afin d'éviter toutes contaminations bactériennes, le PDA utilisé est acidifié jusqu'à 4,5 à 5 en utilisant 1ml de l'acide lactique à 25% pour un flacon de 200 ml de PDA **(ABDELKHALEK M. 2017)**.

Voir l'annexe1.

L'autre milieu utilisé MEA (Malt Extract Agar) qui est un milieu favorable pour la culture des levures et des moisissures. Ce dernier n'est pas acidifié **voir l'annexe**

2.4 Méthode d'isolement.

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée, une quantité de 1g de chaque échantillon prélevé du sol de la grotte a été diluée dans 9ml d'eau physiologique stérile (la solution mère)

Les étapes suivantes sont :

- homogénéiser la suspension mère par agitation du flacon de prélèvement; tout en respectant les conditions d'asepsie et en manipulant toujours dans la zone stérile.
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte de 0.5 à 1ml de chaque suspension.
- L'étaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- Sur les boîtesensemencées, on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement.

L'incubation a été effectuée à 25°C jusqu'au développement apparent de colonies **(BOTTON ET AL. 1990)**.

2.5 Repiquage et purification

Après un bon développement des colonies, on effectue des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné (**GUIRAUD, 1998**).

Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte sur une nouvelle boîte pendant six jours jusqu'à l'obtention des souches pures.

2.6 Conservation

Plusieurs méthodes de conservation des souches ont été employées, elles sont regroupées en deux types :

2.6.1 Conservation de courte durée

- ✓ Les souches issues de purification sur boîtes de Pétri sont conservées à une température ambiante du laboratoire pendant une période allant de deux à quatre semaines.
- ✓ Les souches purifiées ont été cultivées pendant une semaine sur gélose inclinée (PDA) et conservées à 4°C pendant une période allant jusqu'à six mois. C'est la méthode utilisée dans notre cas.

2.6.2 Conservation de longue durée

- ✓ Les souches obtenues d'isolements ont été mises dans des micros billes pour une conservation de plusieurs années.
- ✓ Les souches à intérêt obtenues suite aux purifications ont été lyophilisées dans un lyophilisateur.

2.7 Identification macroscopique et microscopique

2.7.1 Identification macroscopique

L'examen macroscopique des souches isolées permet de déterminer les caractères culturels suivants :

- ❖ La croissance et le développement du champignon.
- ❖ Le diamètre de la colonie.
- ❖ Sa texture.
- ❖ La couleur du thalle.
- ❖ La couleur du revers ainsi que son odeur (**HARRIGAN ET MC CANCE, 1976 ; RINALDI ET AL, 1998 ; BOTTON ET AL, 1990**).

2.7.2 Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue sur un petit fragment mycélien soigneusement prélevé à la marge du thalle à l'aide d'une Anse de Platine stérile. Le fragment prélevé est ensuite coloré avec de Lactophénole ou Bleu de Cotton (**PACKER ET THOMAS, 1990**), ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycélium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et spores, etc. Ensuite, l'observation microscopique était réalisée aux grossissements x10, x40 et x100 au microscope optique. (**SAMSON ET AL, 1988; HAWKSWARTH ET COLL., 1994; HOOGAND, 1995; GAMS ET COLL., 1998**).

3 Test d'antagonisme *in Vitro*

3.1 Les champignons phytopathogène

3.1.1 Origine des souches (*Aspergillus* et *Fusarium*)

Les souches phytopathogènes ont été isolées à partir des tubercules de la pomme de terre. Ce travail a été réalisé par nos collègues Baiche Samah et Dinedane Kenza.

3.1.2 Purification

Les fragments mycéliens sont repiqués dans de nouvelles boîtes de pétries sur le même milieu « PDA ». Ces repiquages ont été répétés jusqu'à l'obtention de colonies d'apparences pures.

3.2 La réalisation du test

Le test d'activité antifongique des isolats purifiés de *Penicillium* consiste à rechercher leur effet antagoniste sur le développement des espèces phytopathogène (*Aspergillus* et *Fusarium*). Alors, nous avons utilisé la méthode de confrontation directe, encore appelée la technique des cultures opposée.

3.2.1 La confrontation par contact direct

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant la gélose appropriée, deux pastilles géloses (6 mm de diamètre), l'une portant l'antagoniste dans ce cas c'est « *Penicillium* » et l'autre le pathogène « *Aspergillus* ». Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (Figure 12) ; les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28 °C pendant six jours. (**HIBAR ET AL. 2005**).

- Le même principe de technique est répété pour le genre *Fusarium*.

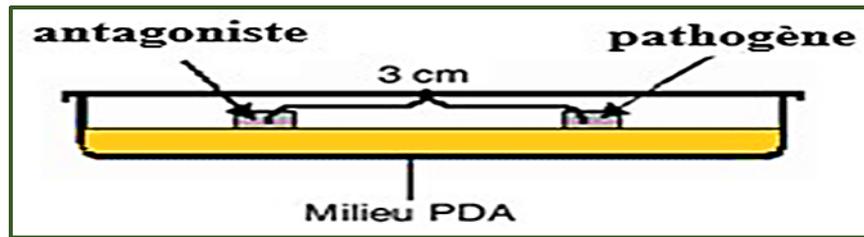


Figure 10 : Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélose. (HIBAR ET AL, 2005)

3.2.2 Évaluation de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne du pathogène est évaluée tous les jours, en mesurant sur le diamètre de la boîte de pétri, le rayon du pathogène se trouvant à côté de l'antagoniste. Cette évaluation est faite toutes les 24 heures pendant 6 jours. (MOUSSAOUI, 2010).

3.2.3 Évaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes

L'évaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (HMOUNI ET AL, 1996) selon la formule suivante:

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

Où :

C_n : est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste.

C_o : est le diamètre moyen des colonies témoins.

Le témoin représente un repiquage du pathogène au centre de la boîte. Des observations microscopiques relatives à l'effet direct de l'agent antagoniste sur l'état du mycélium du pathogène ont été effectuées.

Résultats et Interprétations

1 Résultats d'isollements du Penicillium

1.1 Résultats d'isolement

Les résultats d'isollements des deux échantillons prélevés à partir du sol de la grotte de Beni Aâd représentés dans la figure (11) et le tableau (2).

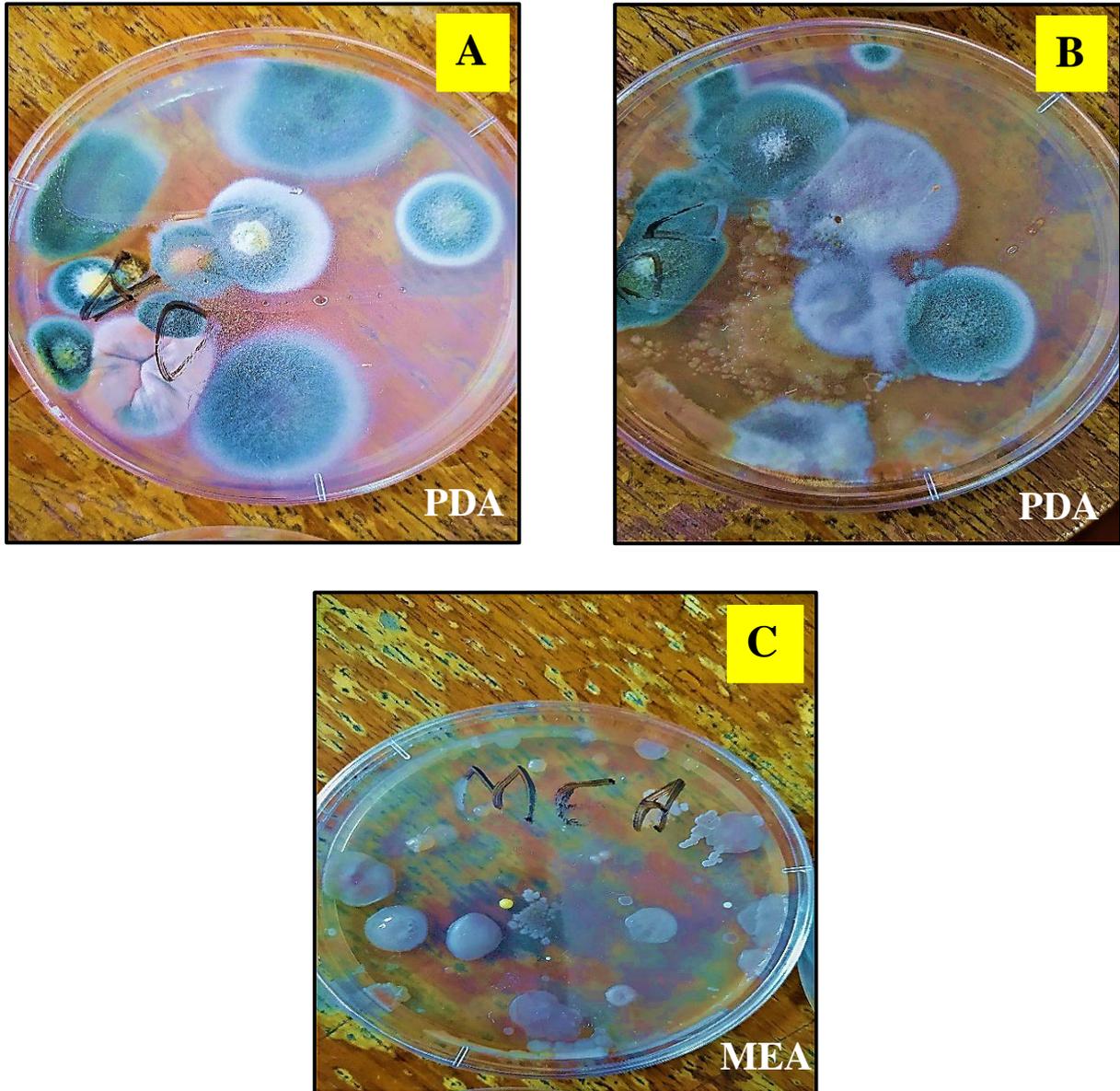


Figure 11 : Résultats d'isolement des moisissures

(A): E₁; (B): E₂; (C): E₃ (PRISE PERSONNEL).

Tableau 2 : Les résultats de l'isolement des moisissures

Échantillons	Nombre de Colonies	Souche	Couleur
E ₁	10	E ₁ 1	Bleu verdâtre à bordures blanches
	1	E ₁ 2	Beige
E ₂	4	E ₂ 1	Bleu verdâtre à bordures blanches
	3	E ₂ 2	Blanche
	1	E ₂ 3	Jaune envahissant
E ₃	26	E ₃ 1	Blanche
	1	E ₃ 2	Jaune

D'après la figure (11) et le tableau (02), on constate que les deux échantillons du sol ont montré une biodiversité moins importante :

- Concernant les échantillons E₁ et E₃, on remarque la présence de deux types de colonies.
- Alors que les résultats d'isolement d'E₂ nous montrent la présence de trois types de colonies.

1.2 Le dénombrement

Après le coulage des 3 boîtes de pétri et l'isolement des souches fongiques antagonistes à partir d'une solution mère on a obtenu les nombres suivants :

Nous n'avons pas dilué la solution mère donc le facteur de dilution égal à 10⁰.

- La boîte **A** : **11 Unités formant Colonie.**
- La boîte **B** : **8 Unités formant Colonie.**
- La boîte **C** : **27 Unités formant Colonie.**

2 Purification et conservation

Les colonies obtenues subissent une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires sur PDA en boîtes de Petri, ensuite, sont incubées pendant une semaine à 30°C. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention des souches pures. Les souches pures doivent être conservées à 4°C (**LEMRISS ET COLL. 2003**).

La purification à partir des échantillons de sol permet d'éclaircir les moisissures et ces compartiments (le mycélium ainsi les spores) isolés, pour obtenir des souches fongiques pures, qui va faciliter après, l'identification macroscopique et microscopique.

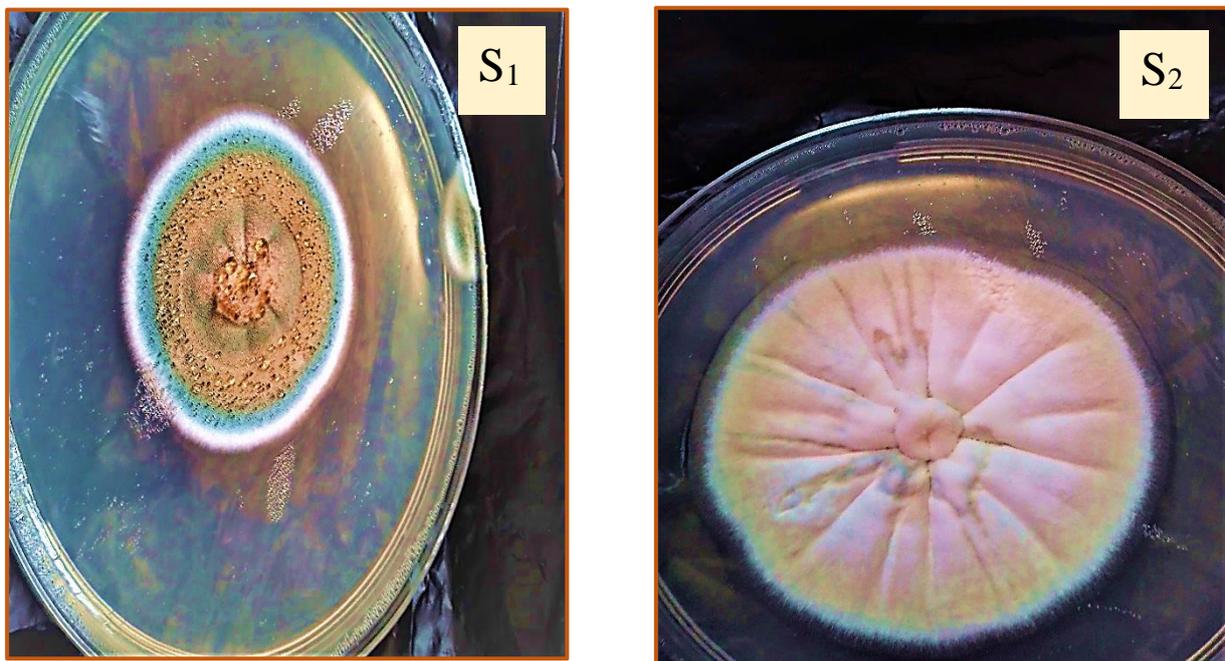


Figure 12 : Aspects macroscopiques des deux des isolats purifiés à partir de sol

S₁ : Souche 1 ; S₂ : Souche 2 (**PRISE PERSONNEL**).



Figure 13 : Tubes de conservation des souches isolées après la purification (**PRISE PERSONNEL**).

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée, car la plus simple consiste à repiquer les souches en tube sur PDA incliné. Les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 30°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**BOTTON ET AL, 1990**).

3 Identification

L'identification des souches de champignons s'est basée sur l'étude macroscopique et microscopique. L'identification de ces souches étant basée essentiellement sur les clés de détermination des genres à savoir les caractères cultureux et la morphologie microscopique selon **BOTTON (1990); GUIRAUD (1998)** ainsi que celles de **CHABASSE ET COLL. (2002)**.

La confirmation de genre a été faite par M^{me} Kholkhal, Maître de conférences (B) à Université Aboubekr Belkaid –Tlemcen.

3.1 Identification macroscopique

D'après **PITT (1991)**, l'examen macroscopique est basé sur une détermination des diamètres de la prolifération des colonies du *Penicillium*, la couleur, la forme, la sécrétion des pigments diffusibles et la vitesse de croissance des colonies. Ces observations se font à l'œil nu et à la loupe binoculaires (4×10 Zeiss 475022).

D'après les résultats que nous avons obtenus après avoir purifié les isolats fongiques à étudier. La (Figure 12) montre deux espèces différentes de champignons, la première à gauche **S₁** apparaît en couleur vert-jaune veloutée et qui ne contient pas de pigments avec un contour périphérique de couleur blanche, la deuxième souche fongique à droite **S₂** apparaît en couleur blanc-beige laineuse et aussi pas de pigment en revers.

Selon (**CHERMETTE ET BUSSIERAS, 1993**). Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons verts, vert bleu, vert gris, vert jaune, gris-bleu, mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces : vert gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*,

jaune pâle, chamois pour *P. nalgioense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii*. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture.

Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses (*P. camembertii*, *P. nalgioense*), funiculeuses (*P. funiculosum*), granuleuses (*P. expansum*, *P. griseofulvum*), veloutées (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. roquefortii*...) (Figure 14).

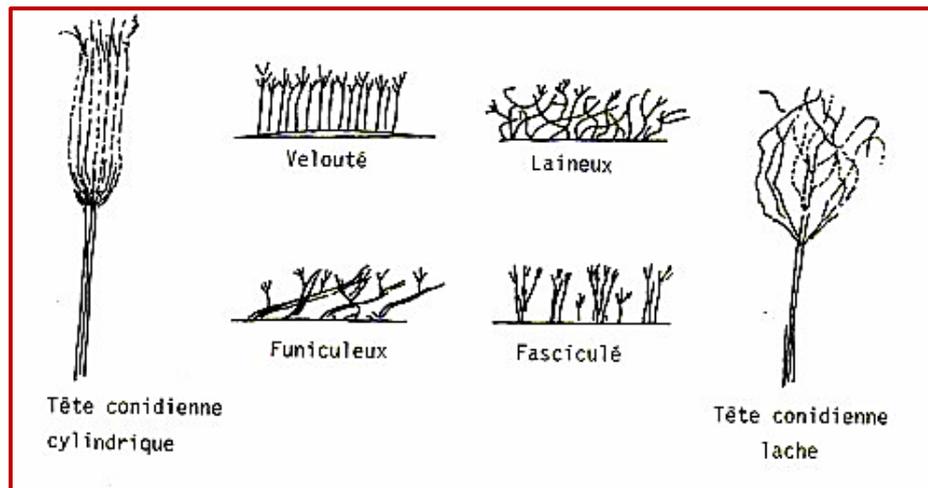


Figure 14 : Caractères du thalle de genre *Penicillium*
(BOTTON ET AL. 1990).

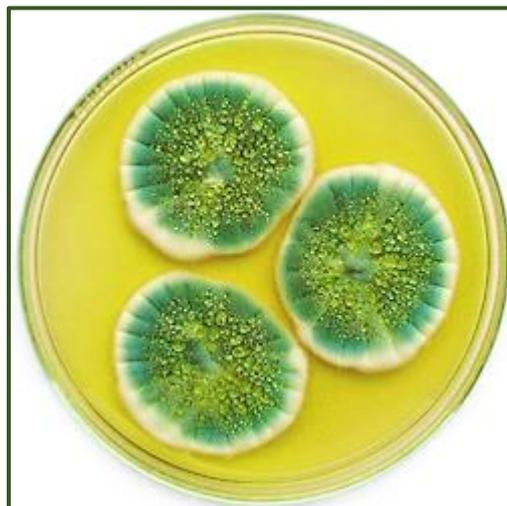


Figure 15 : Observation macroscopique de *Penicillium chrysogenum*
(ANGELUCCI ET AL, 1997).

3.2 Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les méthodes les plus utilisées sont méthode de scotch (CHABASSE, 2002). Cette partie n'était pas réalisée en vue de la situation sanitaire liée au cov19.

Au point de vue morphologique, les individus du genre *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle cloisonné porte les conidiosporés simples ou ramifiés se terminant par un pénicille. Les conidiosporés peuvent être groupés en faisceaux lâches ou rassemblés en corémies (colonne de conidiophore). Les phialides donnent naissance aux spores qui se positionnent alors en chaînes (GAUTHIER, 2016).

+

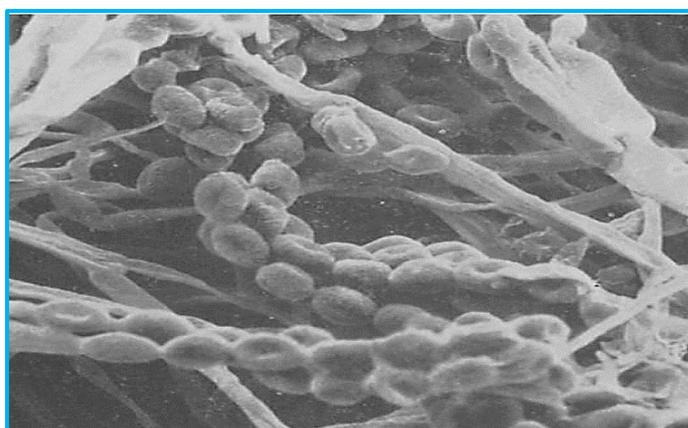


Figure 16 : Observation microscopique des conidiospores et des hyphes filamenteuses de *Penicillium chrysogenum* (Gx100) (NOZOWA ET AL, 1970).

Penicillium chrysogenum anciennement connu sous le nom de *Penicillium notatum*, présente une structure cellulaire eucaryote typique; il possède un cytosquelette de tubuline qui est utilisé pour la motilité et la structure cellulaire (CASTILLO ET ALL, 2006).

La figure 16 montre une image à fort grossissement produite par microscopie électronique à balayage de la structure cellulaire externe de *Penicillium chrysogenum*. Cette image montre les hyphes filamenteux typiques qui contiennent de nombreuses conidies. Les structures oblongues de l'image sont des conidies, les spores asexuées du champignon. (NOZAWA ET AL, 1971) Ces conidies sont à l'origine de pathogénicité chez l'homme comme dans les cas d'allergie et d'endophtalmie. Les conidies proviennent de complexes appelés conidiosporés. La croissance des conidiosporés commence lorsqu'une tige jaillit d'une cellule

du pied. La tige gonfle à la fin et forme une vésicule. Les Sterigmates se forment à partir de la vésicule qui cède la place à de longues chaînes de conidies. (CALVO ET AL, 2002).

4 Test d'antagonisme in vitro

4.1 Les souches phytopathogènes

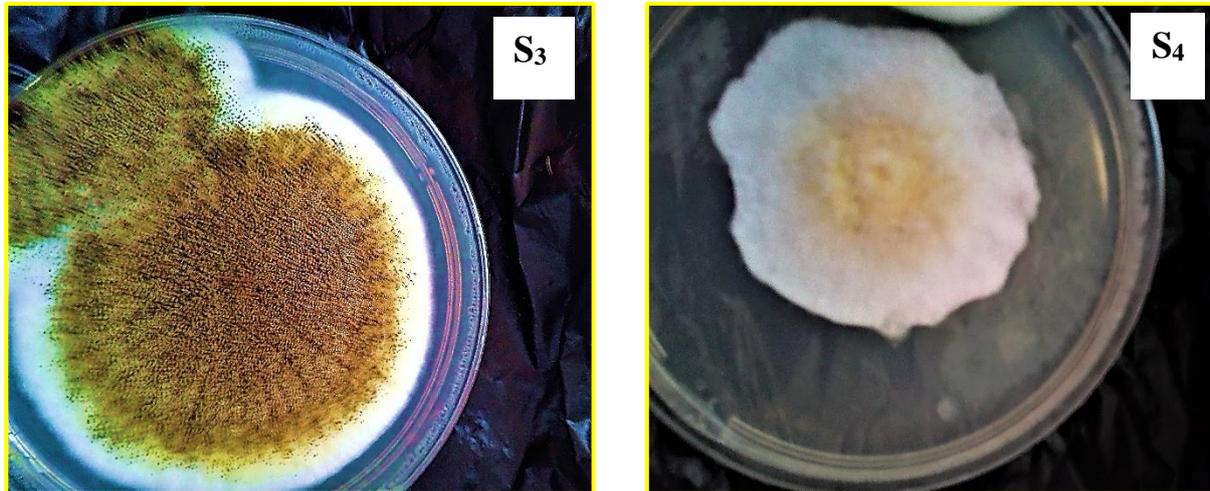


Figure 17 : Aspect macroscopique des deux champignons phytopathogènes après purification (BAICHE ET DINEDANE, 2020).travail en cours de réalisation

L'aspect des colonies des souches fongiques isolées à partir de plantes malades est représenté dans la (Figure 17):

La souche S₃ après 7 jours de culture, se présente sous forme de colonies granuleuses jaunes qui deviennent noires avec un mycélium cotonneux, la croissance est très rapide, avec un couleur de mycélium de substrat est blanchâtre et un mycélium aérien est noir à gris.

D'après les résultats obtenus, et aussi selon (TABUC, 2007) cette espèce fongique est *Aspergillus Niger*. Dont ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. Niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, *A. niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore.

La morphologie microscopique de cette espèce est caractérisée par des têtes conidiennes, bisériées, radiées, est disposée en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiosporés sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses, hyalin ou brunâtre dans leur moitié

supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7-10 x 3-3,5 μm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 μm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses. (TABUC, 2007).

Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé (Figure 18).

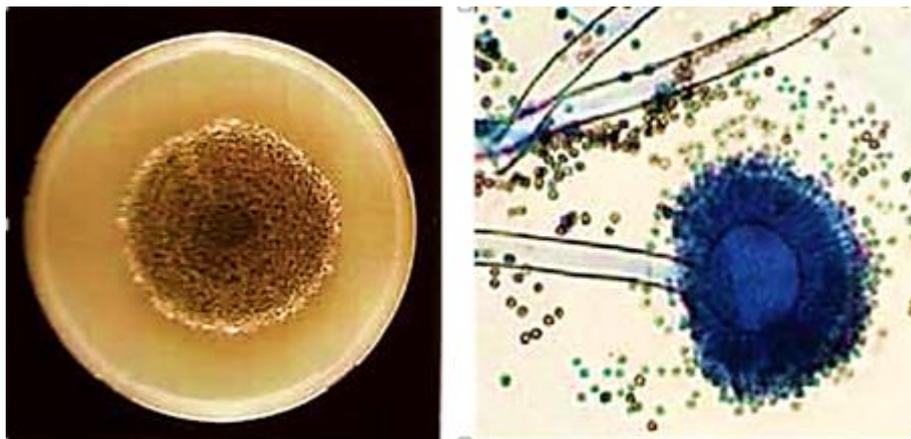


Figure 18: Culture après 7 jours sur gélose au malt à 25⁰c et aspect microscopique (Gx40) d'*Aspergillus Niger* (TABUC, 2007).

La souche S₄ après 7 jours de culture, se présente sous forme colonie aplatie blanche, violette au centre avec un revers incolore violet au centre.

D'après les résultats obtenus, et aussi selon (TABUC, 2007) cette souche fongique appartient au genre *Fusarium*. Dont ce champignon à une vitesse de croissance modérée sur le milieu de culture PDA. Les colonies sont blanches, pêche, rose saumon à violet. Le revers est pourpre.

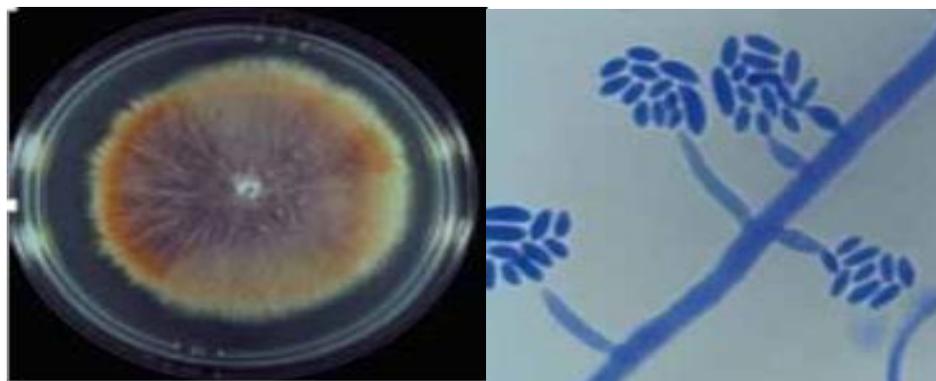


Figure 19 : Culture après 7 jours sur gélose au malt à 25⁰c et aspect microscopique (Gx40) de *Fusarium oxysporum* (TABUC, 2007).

La morphologie microscopique de cette espèce est caractérisée par les microphialides (10-14 x 3,5-5 µm) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont ellipsoïdales, isolées ou postées par de conidiosporés courts et ramifiées. Les microconidies sont abondantes, ovoïdes. Les macrophialides sont éparses ou groupées en sporodochies (Figure 19). Les macroconidies sont fusiformes, plus ou moins courbées, pointues aux deux extrémités, présentant 3 à 5 septums. Elles mesurent 27-65 x 3-5 µm. Les chlamydo-spores, terminales ou intercalaires, formés dans le mycélium et dans les conidies, sont subglobuleux et hyalins (5-15 µm de diamètre). (TABUC, 2007).

4.2 Le test d'antagonisme in vitro

Dans notre étude, on n'a pas pu déterminer l'action antagonisme de deux isolats fongiques de genre *Penicillium* contre deux souches de champignons pathogènes différents qui est l'*Aspergillus Niger* et *Fusarium*. Cette partie n'était pas réalisée à cause de la situation sanitaire liée au cov 19.

4.2.1 La confrontation directe

La lutte biologique contre les souches fongiques fait largement de test l'antagonisme. L'efficacité de la lutte dépend du choix de souche antagonisme performante à partir de critères impliquant une bonne croissance des particularités biologique du matériel fongique utilisé. Selon la méthode appliquée technique de trait. L'action antagoniste se traduit par une faible croissance mycélienne des agents pathogènes durant les 5 premiers jours d'incubation, suivit l'arrêt total de la croissance du côté de la confrontation (antagonistes- pathogènes). (BOUGHEDID ET AL, 2015).

Discussion

Les champignons ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. On les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes (FLORENT, 1993 ; TACHENON, 1999).

D'après (CALVO ET AL, 1980) et plusieurs auteurs tels que (ALVAREZ-RODRIGUEZ ET AL, 2003, ET BOIRON, 1996) ont déclaré qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus* sont des souches autochtones, habituellement isolées à partir de la plupart des terrains. Et aussi le genre *Penicillium* est présent d'une façon constante dans la microflore de différentes régions dans le monde.

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencée par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (RUARK AND ZARNOCH, 1992 ; MADIGAN ET AL., 1997 ; SUBLER AND KIRSCH, 1998 ; PEUK, 2000; SMITH ET COLL., 2000).

Après l'isolement des champignons antagonistes de la solution mère du sol de grottes, on a remarqué selon les résultats obtenus dans le tableau (2) et la figure (11). Il y a une faible diversité microbiologique, alors le genre dominant dans ce lieu de prélèvement c'est *Penicillium*.

Pour le résultat de dénombrement on ne constate que le nombre de colonies dans les deux boîtes de pétri qui contient le milieu PDA est inférieur à celui qui contient le milieu MEA.

D'après (BOTTON ET AL, 1990). L'identification reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la mycologie, elle a pour but de classer les souches fongiques par genres et espèces selon les critères d'identification. Elle est basée sur les deux aspects : microscopiques et macroscopiques. Dont l'aspect macroscopique permet de connaître : les caractères cultureux, la couleur des colonies, la présence ou l'absence de l'exsudat et d'une odeur. Alors que l'aspect microscopique révèle les organes de fructification et la couleur des spores.

Après la purification du genre fongique *Penicillium*, l'espèce S₁ apparaît en colonies duveteuses et lisses; poudreuses Relief peu surélevées ; couleur vert – jaune et souvent de blanc à gris au départ par contre S₂ apparaît en colonies cotonneuses de couleur blanche.

Conidiophores en touffes compactes, très ramifiées, irrégulièrement verticillées avec des ramifications à angle droit ; Phialides ovoïde à ellipsoïdales, atténuées au sommet ; conidies réunies en glomérules au sommet des phialides (**OURARI ET BESSOLTANE, 2017**).

La figure (17) montre deux champignons phytopathogène après l'isolement et la purification, dont d'après (**TABUC, 2007**) et les résultats obtenus l'espèce S_3 c'est un *Aspegillus niger* apparaît en colonies granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Elle est caractérisée aussi par des têtes conidiennes, bisériées, radiées, est disposée en plusieurs colonnes brunâtres ou noires alors que S_4 apparaît en colonies blanches, pêche, rose saumon à violet. Le revers est pourpre. Cette espèce est caractérisée par des microphialides peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont ellipsoïdales, isolées ou postées par de conidiosporés courts et ramifiées. Les microconidies sont abondantes, ovoïdes. Les macrophialides sont éparses ou groupées en sporodochies. Les macroconidies sont fusiformes, plus ou moins courbées, pointues aux deux extrémités.

En ce qui concerne l'antagonisme entre les champignons. L'inhibition de croissance de ces champignons phytopathogènes est due à sa nature à croissance rapide, sécrétions des composés extracellulaires néfastes comme des antibiotiques, enzymes dégradantes la paroi cellulaire telle que des gluconases, endochitinases, et chitinase. (**KHIAT, 2014**).

Chez les champignons, la chitine est un constituant essentiel de la paroi qui entoure et protège les cellules fongiques vis-à-vis de l'environnement. La paroi cellulaire est donc essentielle pour la croissance fongique et pour la résistance du champignon aux agressions externes. Son altération liée à la virulence de l'inoculum par exemple entrainerait une altération du mycélium, filament qui forme de longues chaînes de cellules qui se traduiront par une agrégation, une rétraction et une vacuolisation du cytoplasme (**BENHAMOU N. ET AL, 1996**) ce qui illustre le pouvoir hautement mycoparasitaire que possède le genre *Penicillium* contre les champignons phytopathogène. Une importante lyse au niveau du mycélium (**DAAMI-REMADI M ; EL MAHJOUR M ,2001**), ou une dissolution du cytoplasme (**HOWELL CR, 2003**) pourrait également être la cause de l'inhibition de la croissance mycélienne de *Trichoderma sp ; Fusarium sp ; et Rhizoctonia sp...etc*.

D'après ces chercheurs (**DAAMI-REMADI ET EL MAHJOUR, 2001, HOWELL, 2003, FANG ET AL. 2005, ST LEGER ET WANG 2010, SANDHU ET AL. 2012**). Qui travaille sur l'antagonisme entre les mycètes ils constatent après l'étude microscopique de ces

derniers que la zone de contact entre l'agent pathogène et l'antagoniste pendant le test d'antagonisme par confrontation directe, un enchevêtrement est observé entre l'action de mycoparasitisme qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque le *Penicillium* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur, et l'action d'antibiose qui se manifeste par l'injection des substances (enzymes ou antibiotiques) qui détruisent le mycélium de pathogène.

Conclusion et perspectives

Le présent travail été dans la conception de la lutte biologique par *Penicillium* contre les champignons phytopathogènes "le *Fusarium oxysporum* et "*Aspergillus Niger*.

En effet, les deux champignons du genre *Fusarium* et l'autre genre *Aspergillus*, ont été isolés à partir des tubercules de pomme de terre.

En parallèle l'agent antagoniste *Penicillium* d'origine souterrain, c'est-à-dire isolé à partir de grotte de Beni Aad, Ain fezza.

Selon les résultats de dénombrement, le nombre de colonies chez les deux boîtes qui contiennent le milieu PDA est inférieur à celui qui contient le milieu MEA.

Après la purification des antagonistes fongiques la souche S₁ apparaît en couleur vert-jaune veloutée, absence de pigment et le contour périphérique de couleur blanche par contre la souche S₂ apparaît couleur blanc-beige laineuse et toujours le pigment en revers est absent. En ce qui concerne les champignons phytopathogènes, la souche S₃ apparaît en colonies granuleuses jaunes, la croissance est très rapide, la couleur de mycélium de substrat est blanchâtre et le mycélium aérien est noir à gris. Pour la souche S₃ apparaît en couleur blanche, pêche, rose saumon à violet et le revers est pourpre.

L'identification d'espèces pathogènes et antagonistes n'était pas réalisée en vue de la situation sanitaire liée au cov19.

L'effet de l'activité antagoniste des deux souches de *Penicillium* contre les deux champignons phytopathogènes *Aspergillus* et *Fusarium* a été étudiée selon la méthode de confrontation directe, mais cette partie n'était pas réalisée en vue de la situation sanitaire liée au cov19. Alors d'après les résultats et les chercheurs qui travaillent sur l'effet d'antagonisme entre les champignons montrent que *Penicillium* applique une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *Fusarium* et *Aspergillus*. Ceci s'expliquerait par l'aptitude .l'agent antagoniste à produire des substances volatiles qui provoqueraient la lyse du mycélium et des spores du pathogène et sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène.

En résumé, les résultats de cette modeste recherche nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel antagoniste de *Penicillium* à l'égard des souches d'*Aspergillus* et *Fusarium* testées.

En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial de fixer les points suivants comme perspectives:

- L'élongation des tests des *Penicillium* isolée sur une gamme plus large d'*Aspergillus* et des *Fusariums* pathogènes.
- L'utilisation d'autres techniques du test d'antagonisme in vitro.
- Tester l'effet in vivo des souches *Penicilliums* isolées sur la croissance des *Fusariums* et d'*Aspergillus* pathogènes.
- La confirmation de l'identification des souches isolées (pathogènes et antagoniste) par voies moléculaire

Références bibliographiques

-A-

- **ABDELKHALEK M. (2017)** Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte Kaws – Honaine.). Mémoire de master Université aboubek belkaid - Tlemcen -
- **AGRIOS, G.N. (2005).** Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, USA UK.
- **AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL (2012).** Aspergillus flavus et autres moisissures productrices d'aflatoxines, ANSES, 3p
- **ALABOUVETTE, C., SAIZ-JIMENEZ, C. (2011).** Écologie microbienne de la Grotte de Lascaux. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia de Sevilla, IRNAS-CSIC, Espagne.
- **ALMI H. (2016).** Étude des mycopathogènes de *Lens culinaris* et évaluation de l'effet de deux souches de *Trichoderma harzianum* : cas de la Fusariose et de la Cylindrosporiose. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine P 40.
- **ALVAREZ – ROPDRIGUEZ M.L., LOPEZ-OCANA L., LOPEZ C., RODRIGUEZ N.E. MARTINEZM.J., LARRIBA G & COQUE J-J.R. (2002).** Cork taint of wines: role of filamentousfungi isolated from rock in the function of 2, 4, 6- Trichloroanisol by O methylation of 2, 4, 6 – Trichlorophenol. Applied and Environmental Microbiology. 68 (12): 5860-5869.
- **ANANI B ET BENTALEB S. (2016).** Production des protéases extracellulaires des moisissures du sol : effets de pH et de température. Mémoire du master. Sciences de la nature et de la vie. Université des frères Mentouri. Constantine.
- **AOUAR LAMIA, Sylvain Lerat , Ammar Ouffroukh , Abderrahmane Boulahrouf & Carole Beaulieu (2012).**Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens.« Canadian Journal of plant Pathology ». 165-176.

-B-

- **BAIZE, D. ET GIRARD, M.C., 1995 :** Référentiel pédologique, Paris, 332 pp.

- **BARLES, S., BREYSSE, D., GUILLERME, A. & LAEYVAL, C., (1999)** : Le Sol urbain. Collection VILLES, Economica, Paris. 278p.
- **BENDJAMA A., DJABRI. L., CHOUCANE. T., BOUKARI. A., et TLILI. S. (2014).** La contamination métallique des eaux lacustres des zones humides du PNEK située au Nord-Est algérien, in Actes de la conférence internationale de 2014 sur l'énergétique appliquée et la pollution, p(8).
- **BENDJEMA. A., MORAKCHI. K., MERADI. H., BOUKARI. A., CHOUCANE. T., BELAABED. B. E., ET DJABRI. L. (2011).** Caractérisation des matériaux biologiques issus d'un écosystème naturel « pnek » situe au nord-est de l'Algérie, Journal de la Société algérienne de Chimie, p (45-58).
- **BENHAMOU N; CHET L. (1996).** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and phytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*.86:405-416.
- **BERTRAND YVES ET DE HALLEUX GHISLAIN. (2005).** Chevaux et prairies. France Agricole. France. P:205-223.
- **BLANDEAU E. (2012).** État des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques .thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Angers.
- **BOIRON P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Édition Nathan.p:13-19-69-79.
- **BORDERIE, F., TÊTE, N., CAILHOL, D., ALAOUI-SEHMER, L ., BOUSTA , F .,RIEFFEL, D ., ALEYA , L ., ALAOUI-SOSSÉ ,B. (2014)** .Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments, *Science of the Total Environment*, Elsevier, vol. 484 .pp 43–52.-
- **BOTTON B., BRETON A., PEVRE M., GUY P., LARPENT J.P., VEAU P. (1985).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo
- **BOTTON B, BRETON A, FEVRE M, GAUTHIER S, GUY PH, LARPENT JP, REYMOND P, SANGLIER JJ, VAYSSIER Y ET VEAU P (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2meEd. Masson. 426p
- **BOUCHE P., GUIRGNAR J L., POUCHUS Y V. (2005)** .les champignons Mycologie fondamentale et appliquée Masson Paris

- **BOUCHET PH ., GUIGNARD J L .,MADULO LEBLOND G .,REGLI P .(1989).** Mycologie générale et médicale Masson Paris p1- 2- 3- 4- 5
- **BOUGHEDID K. FILALI M. (2015).** Isolement et identification des champignons antagonistes des champignons phytopathogènes de l'orge. Mémoire en master, Université des Frères Mentouri –Constantine. Page 38.
- **BOVIN, G. (2001).** Parasitoïde et lutte biologique : paradigme ou panacée ? Centre de recherche et de développement en Horticulture, Agriculture et Agrolimentaire. Canada. Vol 2N2 .HTTP: [www.vertigo.Uqam.ca/vol2N2/art8vol2N2 / Guy bovin. Htln.](http://www.vertigo.Uqam.ca/vol2N2/art8vol2N2/Guybovin.html)
- **BROUILLARD C. (2013).** les maladies cryptogamiques et caractéristiques.(en ligne).P consulté le 31.05. 2014. Adresse URL [http://www.rustica.fr/articalem-jardin/maladies-et-parasites/maladies-cryptogamiques -définition et-caractéristiques, 4104. Html](http://www.rustica.fr/articalem-jardin/maladies-et-parasites/maladies-cryptogamiques-definition-et-caracteristiques-4104.html)

-C-

- **CAILLAUD, D., LEVRERO, F., CRISTESCU, R., GATTI, S., DEWAS, M., DOUADI, M., ... MÉNARD, N. (2006).** Gorilla susceptibility to the Ebola virus: The cost of sociality. *Current Biology*, 16(13), R489–R491. doi:10.1016/j.cub.2006.06.017
URLs to share this paper:sci-hub.tw/10.1016/j.cub.2006.06.017 Sci-Hub is a project to make knowledge free. Support →updates on twitter created by
- **CALMES, B. (2011)** .Réponses adaptatives d'Alternaria brassicicola au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases. Thèse de doctorat Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale École Doctorale VENAM.
- **CALVET R. (2003)** : Le Sol propriétés et fonction: Tom I et II. Ed Dunod.
- **CALVO, A., GUARRO, J., SUAREZ, G. & RAMIREZ, C. (1980).** Airborne fungi in the air of Barcelona (Spain). III. The genus *Aspergillus* Link. *Mycopathologia* 71, 41–43. Cameron, J. A., Antonios, S. R., Cotter, J. B. &
- **CALVO, A.M., WILSON, R.A., BOK, J.W. SEPTEMBER (2002).** “Relationship between secondary metabolism and fungal development”. Vol. 66. Pages 447-459.
- **CASTILLO, N.I., FIERRO, F., GUTIÉRREZ, S., February (2006).** “Genome-wide analysis of differentially expressed genes from *Penicillium chrysogenum* grown with a repressing or a non-repressing carbon source”. *Current Genetics*. Vol. 49. Pages 85-96.

- **CAUMARTIN, V. (1963).** Review of the microbiology of underground environments. National Speleology Society Bulletin, Vol . 25. p 1-14. Company. Canada. P 79-82.
- **CHABASSE D., GUIGUEN C L., AUDONNEAU C N. (1999)** .Mycologie médicale Masson Paris p22
- **CHABASSE D. (2008)** .classification des champignons d'intérêt médical ency med ,chir(Édition ,scientifiques et médical elsevier SAS ,Paris) maladie infectieuse 8-088-B-10-9p
- **CHAMPION, R. (1997).** Identifier les Champignons transmis par les Semences. INRA. Paris. Charvet Jean-Paul Le blé dans le monde, Évolution récente de la consommation, de la commercialisation et de la production. Annal de géographie. T.86, n° (478). pp 686-723, 1997. <http://www.presse.fr>.
- **CHEEPHAM N., SADOWAY T., RULE D., WATSON K., MOOTE P., SOLIMAN L. C., ET AL. (2013).** Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. Int. J. Speleol. 42, 35–47. 10.5038/1827-806X.42.1.5 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- **CHERMETTE R., BUSSIERAS J (1993),** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, éditée par le Service de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort
- **CHOUDHARY D. K., PRAKASH A., WRAY V. AND JOHRI B. N. (2009).** Insights of the fluorescent Pseudomonas in plant growth regulation. Current Science, 97 (2):170-179.
- **CLAIRE K. (2016).** Stalactites et stalagmites : les décors calcites des grottes Dossier - Grottes et cavernes, les secrets des profondeurs Futura-Sciences
- **CORBAZ R. (1990)** .Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires romandes (première édition). Lausanne. Suisse, 286

-D-

- **DAAMI-REMADI M; EL MAHJOUB M. (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. L'INRAT .74: 167-186.
- **DAVET P. (1996).** Vie microbienne du Sol et Production végétale (Edn) Inra.Paris.
- **DEACON J.W. (2005)** Fungal Biology, 4th edition (wileyblackwell, 384 pages)

- **DEBUYSER, A. (2003).** Différenciation des propriétés du sol par des apports d'engrais et d'amendements. Cas de l'essai de longue durée des 42 parcelles (versailles). Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. Dijon. France.
- **DEFRESNE P. (2018).** Identification des champignons d'importance médicale. Stage de laboratoire institut national de santé publique Québec
- **DICKSON , GW., KIRK ,PW.(1976).**Distribution of heterotrophic microorganisms in relation to detritivores in Virginia caves (with supplemental bibliography on cave
- **DJOUAMAA, M., DEBABSA, R., BOUASLA, S. (2008).** Comportement morphologique, physiologique et biochimique de trois variétés de blé dur (*Triticum durum*.desf) sous traitement par un fongicide. (TILT 250EC). D.E.S Biologie et Médecine universitaire de Souk – Ahras . PP 41.
- **DUCHAUFOR PH. (1984) :** Abrégé de pédologie. E. D. Masson ; Paris 317 p.
- **DUCHAUFOR, PH. (1997) :** Abrégé de Pédologie. Sol, végétation, environnement. Masson, Paris. 291p.
- **DUCHAUFOR P. (2001).** Introduction à la science du sol, végétation, environnement. END.DUNOD. Paris.

-E-

- **E. SCHUSTER · N. DUNN-COLEMAN · J. C. FRISVAD P. W. M. VAN DIJCK. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger* - a review. Applied Microbiology and Biotechnology, 59(4-5), 426–435.
- **EL ARFAOUI BENAOMAR A. (2010) :** Étude des processus d'adsorption et de désorption de produits phytosanitaires dans des sols calcaires, Thèse de doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, École Doctorale Sciences, Technologies et Santé, Discipline : Chimie de l'environnement.
- **EZZAHIRI, B. (2001).** Les maladies du Blé Identification, facteurs de développement et méthodes de lutte (Bultin Mensuel d'information et de laissons du PNTTA) N°77.P4

-F-

- **FANG W, LENG B, XIAO Y, JIN K, MA J, FAN Y, FENG J, YANG X, ZHANG Y, PEI Y., (2005).** Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied and Environmental Microbiology 71, 363–370.

- **FAO (1999).** Report of a FAO Expert Consultation on the Trade Impact of *Listeria monocytogenes* in Fish Products. FAO Fisheries Report No. 604, FIII/EESN/R604. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- **FLORENT J (1993).** Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêts industriels. Éd. Lavoisier Tec et Doc. 612 p.

-G-

- **GAMS W. HAEKSTRA E.S. AND APTROOT A. (1998).** CBS. Course of mycology. Centraal bureau voor Schimmelcultuur Baarn. The Netherland.
- **GAUTHIER A. (2016).** Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux U.F.R. Des Sciences pharmaceutiques.
- **GELINAS P., (1995).** Répertoire des microorganismes pathogènes transmis par les aliments, Edisem, Saint-Hyacinthe, Québec.
- **GERALDINE, M., SCHOFIELD, M., SCHAAL, K. P. (1981).** A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. J Gen Microbiol.127(2).pp 237–259.
- **GHOSH, N., KUISIENE, N. (2016).** Cheeptham, The cave microbiome as a source for drug discovery: reality or pipe dream? Biochemical Pharmacology.
- **GIRARD, M.C., WALTER, C., REMY, J.C., BERTHELIN, J. AND MOREL, J.L. (2004)** : Sols et environnement, Paris, 816 pp.
- **GRISON P. (1991).** Chronique historique de la zoologie agricole française. INRA. Paris.
- **GROSBELLET C. (2008)** : Évolution et effets sur la structuration du sol de la matière organique apportée en grande quantité, thèse de doctorat, Université d'Angers , Spécialité : Sciences agronomiques, École Doctorale d'Angers.
- **GROTH I., SCHUMANN P., SCHUETZE B., AUGSTEN K., KRAMER I., STACKEBRANDT E. (1999).** *Beutenbergia cavernae* gen. nov., sp Nov., an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. Int. J. Syst. Bacterial. 49, 1733–1740. 10.1099/00207713-49-4-1733 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- **GUIRAUD, J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod. Chapitre, Milieu et réactif. P :522. ISBN : 2 10 003666 1-Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L . Brun S.

and Penn P. (2002). Cahier de formation biofarma : les moisissures d'intérêt médical. Labo Analy de biomédicale.

-H-

- **HAGLUND, W. A., KRAFT, J .M. (2001).** Fusarium wilt. In" Compendium of Pea Diseases Pests", (Eds. Kraft, J.M., Pflieger, F.L.) American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA, 13.
- **HARJUNPAA V., TELEMAN A., KOIVULA A., RUOHONEN L., TEERI T T., TELEMAN O., HARRIGAN W.F. & MCCANCE M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.
- **HARRIGAN W.F. AND MC CANCE M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London .P: 21-277.
- **HAWKER.L.E.LINTON A.H. (1971).** Micro-organismes.pp325-333.
- **HAWKSWORTH D.L., KIRK P.M., SUTTON B.C. AND PEGLER D.N. (1994).** Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8 that. International Mycological Institute, Egham. Unitted .Kingdom.
- **HELLUY S. AND HOLMES J. C. (2005).** Parasitic manipulation: further considerations. Behave. Processes. 68, 185-99.
- **HIBAR,I C, DAANNI-REMADI,M., KHIAREDDINE,IL., EI MAHJOUB,M,(2005)** Effet inhibiteur in vitro et in vivo du Trichoderma harzianum sur Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 9 (3), 163-171.
- **HILLEL, D., (1982):** Introduction to Soil Physics. Ed. Academic Press. New York, USA, 364 p.
- **HMOUNI, A., HAJLAOUI, M. R., & MLAIKI, A. (1996).** Résistance de Botrytis cinerea aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. EPPO Bulletin, 26(3-4), 697–705. doi:10.1111/j.1365-2338.1996.tb01513.x
- **HOAGLAND D.R. & ARNON D.I. (1950).** The water-culture method for growing plants without soil. Circ. 347, Berkeley Calif. Agric. Exp. Station. Univ. Calif
- **HOWELL C. R. (2003).** Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4-10.

- **Hsu, MJ., Agoramoorthy, G. (2001)**. Occurrence and diversity of thermophiles soil microfungi in forest and cave ecosystems of Taiwan. *Fungal Diversity*, vol.7. pp 27-33.
- **HU, B., ZENG, L.-P., YANG, X.-L., GE, X.-Y., ZHANG, W., LI, B., SHI, Z.-L. (2017)**. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLOS Pathogens*, 13(11), e1006698.

-J-

- **ITO, Y., NOZAWA, Y., SETOGUTI, T. (1970)**. “Examination of several selected fungi by scanning electron microscope”. *Mycopathologia et Mycologia applicata*. Vol. 41. Pages 299-305.

-J-

- **JIJAKLI M.H. (2003)**. La lutte biologique en phytopathologie. In : *Phytopathologie. Le poivre P* (eds). Bruxelles, Belgique : De Boeck. 289-317.
- **JOLY, P.B., PARADEISE, C. (2003)**. Agriculture et alimentation : nouveaux problèmes, nouvelles questions. *Sociologie du Travail*, n° (45), p. 1-8.
- **JONES, B. (2010)**. Microbes in caves: agents of calcite corrosion and precipitation. *Geological Society, London, Special Publications*, 336(1), 7–30. doi:10.1144/sp336.2
URL to share this paper: sci-hub.tw/10.1144/SP336.2 Sci-Hub is a project to make knowledge free. Support → updates on twitter created by

-K-

- **KACHOUR, L. (2005)**. Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité, thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar d’Annaba, p(203).
- **KANOUNI L. (2019)**. Inhibition des champignons phytopathogènes par *Rhizobium*. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Page 17.
- **KATTERE T. AND ANDOREN O. (2001)**. The ICBM of analytically solved models of soil carbon, nitrogen and microbial biomass. *Ecol. Model.* 130: 199-207.
- **KHIAT I. (2014)**. Étude de la confrontation des souches fongiques isolées à partir du sol de forêt brûlée de la région de Mila. Mémoire en Master. Université Frères Mentouri Constantine 1 Page 39.

- **KIM,S.B.,SEONG,C.N.,JEON,S.J.,BAE,K.S.,GOODFELLOW,M.(2004).**
Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of streptomyces yeochonensis sp.nov.int.J.Syst.Evol.Micobiol.54.pp211-214.
- **KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., EGHAM, U.K. AND STOPHES, J.A. (2001).** Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi, 9th edn .CABI. Bioscience.UK. Centre and central Bureau Voie. Utrecht. The Net.
- **KIRK M. P., CANNON P. F., MINTER D. W. ET STALPERS J. A., 2008 -** Dictionary of the fungi, 10ème edition. Edited by PM Kirk, International Mycological Institute, Egham, UK, P. F. Cannon, CABI, the UK, J A Scalpers, CBS, The Netherlands . September 2008 / Hardback / 784 Pages / 9780851998268. <http://www.amazon.co.uk/Dictionary-Fungi-10th-Kirk/dp/0851998267>.
- **KLEIN, D.A., PASCHKE, M.W. (2004).** Filamentous Fungy: The indeterminate lifestyle and microbial ecology. Microbial Ecology. 47: 224-235.
- **KOUASSI M. (2001).** La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides. Vertigo. 2 (2): 4000-4101.

-L-

- **LAMBERT L. (2010).** Lutte biologique aux ravageurs : Application au Québec. Centre universitaire de formation en environnement. Université de Sherbrooke. Québec. Canada.
- **LARPENT J. P. ET SANGLIER J. J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris. 130 pages (31-61)
- **LE CALVEZ T. (2009).** Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Interactions entre organismes. Université Rennes 1. Français
- **LECELLIER A (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat biologie-biophysique. Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE école doctorale sciences technique santé
- **LEMRISS S., LAURENT F., COUBLE A., CASOLI E., LANCELIN J.M., SAINTPIERRE-BONACCIO D., RIFALI S., FASSOUANE A., BOIRON P. (2003).** Screening of polygenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can. J. Microbiol 49:669-74.

- **LEPOIVRE P (2003).** Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. 1st Édition, de Boeck, Bruxelles (Belgium), pp111-159..
- **LOQMAN, S. (2009).** la lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine Marocaine. Thèse de doctorat en biologie et physiologie végétale. Université de Reims Champagne-Ardenne. France.pp216.

-M-

- **MAC CARTHY, P., CLAPP C.E., MALCOM R.L. AND BLOOM P.R. (1990):** Humic substances in Soil and crop sciences: Selected readings. Madison, Wisconsin, Soil Sci. Society of America. Mackowiak, C. L., P. R. Gross and B. G. Bugbee (2001). "Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat." SoilSci. Soc. Am. J. 65(6): 1744-1750.
- **MADIGAN M.T., MATINKO J.M AND PARKER J. (1997).** Brook biology of microorganisms, 8th edn. USA.
- **MAIER, RM., PEPPER IL., GERBA CP. (2000).** Environmental microbiology, microorganisms in surface soils. In. Academic press. A. Harcourt sciencead technology
- **MEYER, A., DEIANA, J ., BERNARD, A. (2004).** Biosciences et techniques^s
- **MOUSSAOUI M. 2010.** Développement et extraction des métabolites secondaires de Trichoderma viride et leurs effets biologiquement actifs. Mémoire. Université Mentouri. Constantine.
- **MUELLER M., SCHMI J.P. (2007).** Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? Biodiversity and Conservation. 16: 1-5.

-N-

- **NAKKEERAN S., FERNANDO W.G.D. & SIDDIQUI Z. A. (2005).** Plant growth promotion rhizobacteria formulations and its scope in commercialisation for the management of pests and diseases. In Siddiqui Z. A. (ed.) PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. Dordrecht. The Netherlands, 313
- **NASERAOUI B. (2006).** Les champignons parasites des plantes cultivées. Chapitre 3 et 4. p : 320-447.

- **NEERDAARD, P. (1981).** Risk for the EPPO Region from seed-borne pathogens. EPPO Bull.11, 207-212.
- **NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W.F.O. (1983).** Fusarium species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. Editor.
- **NORTHUP E D, KATHLEEN H. (2001).** Geomicrobiology Journal, 18:199–222, Geomicrobiology of Caves: A Review

-O-

- **OERKE, E.-C. (2005).** Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science, 144(01), 31. Doi: 10.1017/s0021859605005708 URLs to share this paper:sci-hub.tw/10.1017/S0021859605005708Sci-Hub is a project to make knowledge free.support →updates on twitter created by
- **OURARI A. ET BESSOLTANE N. (2017).** Contribution à l'étude comparative des activités antibactériennes des deux extraits bruts (antibiotique et l'huile) synthétisés par Penicillium sp isolés des sols des zones Abd- El- Malek – Ramden et de Hassi Mamèche (Mostaganem). Mémoire de Master. Université Badji Mokhtar Annaba P (26-27)

-P-

- **PACKER H.L. AND THOMAS C.R. (1990).** Microbiological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. Biotechnol-Bioenerg. 35:870-881.
- **PALMER, M V., PALMER AN. (1994).** Sulphate-induced diagenesis in the Madison, South Dakota, Aquifer.In: Sasowsky ID, Palmer MV, editors. Breakthroughs in karst geomicrobiology and redox geochemistry:abstracts and Ž eld-trip guide for the symposium held February 16 through 19, 1994, Colorado Springs, Colorado. Spec Pub 1. Charles Town, WV: Karst Waters Institute, Inc. pp 57–58.
- **PARC NATIONAL DE TLEMCEN (2006).**.. Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar.
- **PAUL E. A. & CLARK F. E. (1996).** Soil microbiology and biochemistry. Two end edition. Academic Press. San Diego, California (USA).P: 340.
- **PECK, SB. (1986).** Bacterial deposition of iron and manganese oxides in North American caves. National Speleology Society Bulletin, Vol.48 .pp 26-30.

- **PERRIN, R. (1988).** La fonte des semis en pépinières observation et expérimentation 1987. Document interne CEMAG REP INRA. 1988 .21p.
- **PEUK A.D. (2000).** The chemical composition of xylen sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different Francina vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. *Am. Enol. Viticult.* 51:329-339.
- **PITT, J.I. (1991).** A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Food Research Laboratory, N.S.W., Australia. Press, New York.
- **PITT J.I ET HOCKING A.D. (1997).** Fungi and food spoilage. 2ème Edition. London: Blackie Academic and Professional
- **PITT J I. (2002).** The toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin.* 56(1): 184-192.
- **POCHON J., TARDIEUX P. 1962** - Techniques d'analyse en microbiologie du sol.Éditions de La Tourelle, 112 p.
- **POHL, CH., KRIEL ,W., VENTER, P., VAN HEERDEN E.,ALBERTYN ,J.(2007)** .The diversity of culturable airborne fungi in an active South African gold mine. *South African Journal of Science*, vol.103.pp 277-278.
- **PORCA, E., JURADO, V., MARTIN-SANCHEZ, P. M., HERMOSIN, B., BASTIAN, F., ALABOUVETTE, C., & SAIZ-JIMENEZ, C. (2011).** Aerobiology: An ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves. *Ecological Indicators*, 11(6), 1594–1598.
- **PRAPAGDEE B., KUEKULVONG C. AND MONGKOLSUK S. (2008).** Antifungal potential of extracellular metabolites produces by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4, 330-337.
- **PRESCOTT,C.,HARLEY,JP.,KLEIN,DA.(2003).**2ème edition, pp 113-121-539

-Q-

- **QUENEA K., (2004)** : Étude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sol d'un chrono séquence forêt/, mais (Cestas, sud-ouest de la France), Thèse de doctorat de l'université Paris VI, Spécialité : Fonctionnement physique, chimique et biologique de la biosphère continentale

-R-

- **RAHOUI M., SOUDI B., CHIANG C., BADRAOUI M., MARCOEN J.M. ET BENZAKOUR M. (2001).** Atlas de la qualité des sols et des eaux souterraines dans le périmètre irrigué des Doukkala. Réalisation : A.Bamouh.Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. P : 1-29.
- **RAVEN P H ., EVERT R F .,EICHHORN .(2007).** biologie végétale Boeck université 2 édition p 261-286
- **REBOUX G., BELLANGER A., ROUSSEL S., GRENOUILLET F., ET MILLION L (2010).** Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, Revue française d'allergologie 50 : 611–620.
- **RINALDI C., SUTTON A. AND FOTHERGILL S.R. (1998).** The morphology of fungi. Appl. Environ. Microbiol.67:123-129.
- **ROBERT, M., (1996) :** Le sol: interface dans l'environnement, ressource pour le développement, Paris, 241 pp.
- **RUARK G.H., ZARNOCH S.J. (1992).** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. Soil Sc. Soc. Am.J. 56:1945-1950.

-S-

- **SAMSON, R.A. AND PITT, J.I. (1985).** Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics.
- **SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C. ET FILTENBORG O. (1998).** Introduction of food and airborne fungi. 6th edition. Centraal bureau voor schimmel cultures.Utrecht
- **SANDHU SS, SHARMA AK, BENIWAL V, BOEL G, BATRA P, KUMAR A, JAGLAN S, SHARMA AK, MALHOTRA S.,(2012).** The myco-biocontrol of insect pests, factor involved mechanism, and regulation. Journal of Pathogen. 2012,126819.
- **SCHABEREITERGURTNER,C.,SENZJIMENEZ,C.,PINAR,G.,LUBITZ,W.,RO LLEKE,S.(2003).** Phylogenetic diversity of bacteria associated with Palaeolithic paintings and surrounding rock in two Spanish caves (Llonin and la Garma).Microbiology ecology 47 (2004).pp235-247
- **SCHWARTZ D. (2011).** Sol : les bases. Formation professeurs SVT-Rouffach.
- **SHUKLA.G. (2010).** Soil enzymology.springer :berlin.pp :384.
- **SIMMONS, G.G. (1993).** Alternaria themes and variation (63-72). Mycotaxon 48, 109-140.

- **SMITH C.K., COYEA M.R., MUNSON A.D. (2000).** Soil carbon, nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App.* 10:75-78.
- **SOMAVILLA, J F., KHAYYAT, N., ARROYO, V. (1978).** A comparative Investigació n y Museo d'Altamira, Monograf ía 9, Ministerio.
- **SOUCHIER,B ., DUCHAUFOUR ,P ., BONNEAU,M .(1994)** .pédologie:2 constituants et propriété du sol. Deuxième édition. Paris milan barcelone.pp 147-149-151.
- **ST LEGER RJ, WANG C., (2010).** Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 901–907.
- **SUBLER S. AND KIRSH K.S. (1998).**Spring dynamics of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthworm middens in no-till cornfield. *Bio. Fert. Soils.* 26:243-249.

-T-

- **TABUC, C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest .Spécialité : pathologie, mycologie, génétique et nutrition. 190p
- **TACHENON A (1999).** LA science des champignons. <http://www.Tachenon.com>.
- **TESSIER, D. (1999).** La capacité d'échange cationique et son importance dans la gestion actuelle des sols. Extrait des comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France. Tome 85, N°2.
- **THILAGAM, R., KALAIVANI, G., & HEMALATHA, N. (2018).** Isolation and identification of phytopathogenic fungi from infected plant parts. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10(1), 26. doi:10.22159/ijcpr.2018v10i1.24404
URL to share this paper sci-hub.tw/10.22159/ijcpr.2018v10i1.24404 Sci-Hub is a project to make knowledge free.support →updates on twitter created by
- **TOMASHOW L.S. (1996).** Biological control of plant pathogens. *Current Opinion in Biotechnology.*77: 343.347.

- **TOMCZYK-ZAK K., ZIELENKIEWICZ U. (2016).** Microbial diversity in caves. *Geomicrobiol. J.* 33, 20–38. 10.1080/01490451.2014.1003341 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- **TSCHEN, J. S. M., & KUO, W. L. (1985).** Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Chih wu PAO hu sue hui hui kan= Plant protection bulletin*

-U-

- **UNEP (2000).** Spill of liquid and suspended waste at the Aural S.A. retreatment plant in Baia Mare. United Nations Invar-omen programme (UNEP) and Office for the Co-ordinate-tion of Humanitarian Affairs (OCHA) assessment mission to Romania, Hungary, Federal Republic of Yugoslavia reports. Geneva.

-V-

- **VANDER HEIJDEN, M.G.A., KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M., MOUTOGLIS, P., STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., WIEMKEN, A., SANDERS, I.R. (1998).** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 396: 69-72. *vegetation: ecology*. 84: 2269-2280.
- **VANDER PULTEN, W.H. (2003).** Plant defence belowground and spatiotemporal processes in natural
- **VANDERWOLF, K., MALLOCH, D., MCALPINE, DF. FORBES GJ. (2013)** .A world review on fungi, yeast, and slime moulds in caves. *International Journal of Speleology*, vol. 42 (1).pp77-96.
- **VENKATESWARA RAO, J., KAVITHA, P., JAKKA, N. M., SRIDHAR, V., & USMAN, P. K. (2007).** *Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behaviour in Brine Shrimp, Artemia salina. Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(2), 227–232.
- **VITOUSEK, P M., HOWARTH RW. (1991).** Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochem*, vol .13. pp 87-115.
- **VOLZ, P., YAO, J. (1991)** .Micro-fungi of the Hendrie River Water Cave, Mackinac County, Michigan. *National Speleological Society Bulletin*, vol. 53 (2).pp 104-106.

-W-

- **WILD, A. (1993).** Soils and environment. Cambridge University press, Cambridge. pp281.

-y-

- **YAJUAN J L., MATTHEW C., HODSON, BENJAMIN D H .(2006)** BMC Evolutionary Biology Research article Open Access loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage : Phylogenetic structure of kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes 1471-2148-G-74
- **YUN, Y., XIANG, Y., WANG, H., MAN, B., LIU Q., DONG, Q., WANG, R. (2015).** Five years monitoring of bacterial communities in dripping water from the Heshang Cave in Central China: Implication for paleoclimate reconstruction and ecological functions, Geomicrobiology Journal.

-z-

- **ZHANG, Z. F., LIU, F., ZHOU, X., LIU, X. Z., LIU, S. J., AND CAI, L. (2017).** The culturable mycobiota from Karst caves in China, with

Annexes

Annexe 1

Composition de milieu PDA : Potatoes Dextrose Agar.

- Poudre 21g.
- Eau distillée 500ml.

Mode d'emploi

Préparation de milieu PDA

Préparé 21g de poudre PDA dans 500 ml d'eau distillée, chauffer et bien mélanger avec l'agitation, après cela, nous remplissons deux flacons de 250ml avec ce mélange obtenu, les milieux seront portés à une cocote minute pour une stérilisation à température 120°C pendant 20min pour éviter la contamination bactérienne, le milieu PDA est acidifié en lui ajoutant 1ml d'acide lactique (25%), après solidification du milieu on va couler 2 boîtes de pétri.

Annexe 2

Composition de milieu MEA : Malt Extract Agar.

- Poudre 6.84g.
- Eau distillée 200ml.

Mode d'emploi

Préparation de milieu MEA

Préparé 6.84g de poudre MEA dans 200ml d'eau distillée, chauffer et bien mélanger avec l'agitation après cela, nous remplissons un seul flacon de 250ml avec ce mélange obtenu, les milieux seront portés à une cocote minute pour une stérilisation à température 120°C pendant 20min pour éviter la contamination bactérienne, après solidification du milieu on va couler aussi 2 boîtes de pétri.