

لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**
لمدرسة لوطية الأحياء الفحرة - لحراش - لجزائر-
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH-ALGER

Thèse

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD en Sciences
Agronomiques**

Option: Agro-écosystèmes et stress biologiques

Thème

**Champignons à potentiel mycoherbicide : identification,
efficacité et formulation.**

Préparée par : M^{lle} ABDESSEMED Nesma

Soutenue le xx /yy/zz devant le jury composé de :

Président :	M. BOUZNAD Z.	Professeur (ENSA).
Directeur de thèse:	M ^{me} ZERMANE N.	Professeur (Univ., Alger 1).
Examineurs :	M ^{me} KRIMI Z.	Professeur (USD, Blida).
	M. TAOUTAOU A.	Maître de Conférences A (ENSA).

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Cette thèse a été développée au sein du laboratoire de Phanérogames Parasites affilié au laboratoire de Phytopathologie et Biologie Moléculaire de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et partiellement au laboratoire de l'Institut de la Protection Durable des Végétaux, Centre National de Recherches, Portici, Italie.

Je tiens à exprimer ma gratitude en premier lieu à la personne qui m'a encadré et formé durant ces cinq années de thèse, en l'occurrence Madame Zermane Nadjia Professeur à l'université d'Alger 1. Je la remercie pour sa patience, ses conseils et ses orientations qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie M. Vinale Francesco pour la confiance qu'il m'a accordée en m'offrant l'opportunité d'effectuer une partie de ce travail sous sa direction et au sein de son équipe.

Je tiens à remercier le Professeur Bouznd Zouaoui d'avoir accepté de présider mon jury.

Mes remerciements vont aussi au Pr. Krimi Zhoulikha et au Dr. Taotaou Abdelemoumen pour avoir bien voulu faire partie du jury et d'examiner mon travail de recherche.

Je tiens aussi à remercier tous mes enseignants de l'ENSA grâce à qui je suis devant vous aujourd'hui, je cite particulièrement messieurs Traikia Hamide et Abdelkrim Hacène.

Je remercie M. Lallouchi Mohamed pour la prise de photos, ainsi que messieurs Lahad Arezeki et Latati Mourad de m'avoir orienté en bioinformatique et en statistiques

Mes remerciements s'adressent également à :

- *mes chers amis Sara et Sabri pour leur présence, aide, soutien, conseils.....etc et sans qui je n'aurais pas pu terminer ce travail.*
- *tous mes amis et camarades, particulièrement Bilal, Ghilès, Massi, Imen et Khawla.*
- *mes chères amies ; Sara et Betty*

Enfin, je souhaite remercier les familles Abdessamed et Chergui pour leur soutien constant. Cette thèse, est l'aboutissement de longues années d'études, je la dois beaucoup à mes parents pour leur soutien indéfectible, et qui ont toujours su me redonner confiance afin

de mener à bon port cette thèse. A ma tante Khadidja, je ne saurais te remercier car tu es mon ange gardien, Un GRAND MERCI à ma tante Amina pour son soutien, tu es la meilleure. Enfin, je remercie mes deux chères sœurs Farah et Khouloud pour leur patience et leur compréhension.

Après avoir présenté mes remerciements à toutes les personnes que je viens de citer, je veux dédier ce travail à mes chers grands-parents, qui nous ont quitté il n y a pas longtemps.

Tables des matières

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les adventices et notion de mycoherbicide	4
1.1. Biologie des adventices	4
1.2. Principales caractéristiques des adventices	4
1.3. Répartition géographique des adventices en Algérie	5
1.4. Lutte biologique avec les champignons	6
1.5. Potentiel mycoherbicide	6
1.6. Formulation.....	7
1.6.1. Formulation solide	7
1.6.2. Formulation liquide	7
1.7. Commercialisation des mycoherbicides	7
2. Données sur les adventices et champignons étudiés	9
2.1. Les adventices étudiées	9
2.1.1. <i>Xanthium strumarium</i> L.	9
2.1.1.1. Position systématique.....	9
a. Classification classique	9
b. Classification phylogéniques	9
2.1.1.2. Description botanique et biologique	10
2.1.1.3. Caractères écologiques.....	11
2.1.1.4. Distribution géographique.....	11
2.1.1.5. Cultures infestées.....	11
2.1.1.6. Nuisibilité de <i>Xanthium strumarium</i>	11
a. Nuisibilité primaire.....	11
a.1. Nuisibilité directe.....	11
a.1.1. Compétition	11

a.1.2. Allélopathie	12
a.2. Nuisibilité indirecte.....	12
b. Nuisibilité secondaire	12
b.1. Stock semencier.....	12
2.1.2. <i>Sonchus oleraceus</i> L.	12
2.1.2.1. Position systématique.....	13
b. Classification phylogénique	13
2.1.2.2. Description botanique et biologique	13
Figure 2. Aspect de <i>Sonchus oleraceus</i> L. (Asteraceae).	14
2.1.2.3. Caractères écologiques.....	14
2.1.2.4. Distribution géographique.....	15
2.1.2.5. Cultures infestées.....	15
2.1.2.6. Nuisibilité du <i>Sonchus oleraceus</i>	15
a. Nuisibilité primaire	15
a.1. Nuisibilité directe.....	15
a.1.1. Allelopathie	15
a.2. Nuisibilité indirecte.....	15
b. Nuisibilité secondaire	16
2.1.3. <i>Convolvulus arvensis</i> L.	16
2.1.3.1. Position systématique.....	16
b. Classification phylogéniques	17
2.1.3.2. Description botanique et biologique	17
2.1.3.3. Caractères écologiques.....	18
2.1.3.4. Distribution géographique.....	18
2.1.3.5. Cultures infestées.....	19
2.1.3.6. Nuisibilité de <i>Convolvulus arvensis</i>	19
a. Nuisibilité primaire	19

a.1.Nuisibilité directe.....	19
a.1.1. Compétition	19
a.1.2. Allélopathie	19
a.2. Nuisibilité indirecte.....	19
b. Nuisibilité secondaire	20
b.1. Stock semencier.....	20
2.2. <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	21
2.2.1. Généralités sur les <i>Alternaria</i>	21
2.2.2. Position systématique	22
2.2.3. Biologie des <i>Alternaria</i>	22
2.2.4. Processus infectieux des <i>Alternaria</i>	22
2.2.4.1. Conservation.....	22
2.2.4.2. Pénétration et invasion	23
2.2.4.3. Dissémination	23
2.2.5. Métabolites produits par les <i>Alternaria</i>	23
2.2.6. Potentiel mycoherbicide des <i>Alternaria</i>	24
Chapitre II. Identification morphologique et moléculaire des champignons associés aux maladies dominantes sur les trois adventices : <i>Xanthium strumarium</i> L., <i>Sonchus oleraceus</i> L. et <i>Convolvulus arvensis</i> L.	
I. Introduction	25
II. Matériel et méthodes	26
1. Matériel utilisé	26
1.1. Matériel végétal.....	26
1.2. Matériel fongique	26
1.2.1. Isolement	26
1.2.2. Repiquage.....	27
1.2.3. Monospore des isolats fongiques.....	27
1.2.4. Sélection des isolats fongiques.....	27

2. Identification des isolats fongiques sélectionnés	27
2.1. Identification morphologique	27
2.2. Identification moléculaire	28
3. Tests de pathogénicité	29
3.1. Préparation de la suspension de spores	29
3.2. Test <i>in-vitro</i>	29
3.3 Test <i>in-vivo</i>	29
III. Résultats	30
1. Symptomatologie et aspect cultural et morphologique des conidies	30
1.1. <i>Alternaria alternata</i> isolat X3	30
1.2. <i>Alternaria alternata</i> isolat S1	31
1.3. <i>Alternaria alternata</i> isolat C1	31
2. Identification moléculaire	34
3. Pathogénicité	34
IV. Discussion	35
Chapitre III. Évaluation du potentiel herbicide de trois isolats d'<i>Alternaria alternata</i> et de leurs formulations à l'égard de leurs adventices cibles.	
I. Introduction	37
II. Matériel et méthodes	38
1. Matériel végétal	38
2. Matériel fongique	39
2.1. Préparation de la suspension de spores	39
2.2. Préparation des formulations	39
2.2.1. Formulation liquide	39
2.2.2. Formulation solide	39
3. Herbicide «Mustang»	40
3.1. Estimation de la quantité d'herbicide utilisée et le choix de la dose	40

4. Évaluation de l'effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3, S1 et C1 à l'égard de leurs adventices cibles.	41
4.1. Essais <i>in-vitro</i>	41
4.1.1. Évaluation de l'effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1 sur le taux de germination de graines de <i>Xanthium strumarium</i> et <i>Sonchus oleraceus</i> , respectivement.....	41
L'évaluation de l'effet d' <i>A. alternata</i> a porté seulement sur les graines de <i>Xanthium strumarium</i> et de <i>Sonchus oleraceus</i> du fait de la difficulté de trouver les graines de <i>C. arvensis</i> . 41	
4.1.1.1. Graines de <i>X. strumarium</i> et de <i>S. oleraceus</i>	41
4.1.1.2. Enrobage des graines de <i>X. strumarium</i> et <i>S. oleraceus</i> et test de germination.	41
4.1.2. Évaluation de l'effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3, S1 et C1 sur les feuilles détachées de <i>X. strumarium</i> , <i>S. oleraceus</i> et <i>C. arvensis</i> , respectivement <i>in-vitro</i>	42
4.1.3. Évaluation de l'effet d' <i>A. alternata</i> isolat C1 sur deux autres espèces de la famille des Convolvulacées (<i>Convolvulus althaeoides</i> L. et <i>Cuscuta campestris</i> Yunker).	42
4.1.3.1. Essai sur les feuilles détachées de <i>Convolvulus althaeoides</i>	42
4.1.3. 2. Essai sur la germination des graines de <i>Cuscuta campestris</i>	42
a. Levée de la dormance tégumentaire	42
b. Test sur la germination des graines de <i>Cuscuta campestris</i>	43
4.2. Essais <i>in-vivo</i>	43
4.2.1. Évaluation de l'effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1 et de leurs formulations sur les plantules de <i>X. strumarium</i> et <i>S. oleraceus</i> en pots.	43
4.3. Essai <i>in-situ</i>	44
4.3.1. Évaluation de l'effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et C1 et de leurs formulations sur les plantules de <i>X. strumarium</i> et <i>S. oleraceus</i> au champ	44
4.3.1.1. Dispositif expérimental	44
4.3.1.2. Application des traitements	46
5. Gamme d'hôtes	47
6. Traitements statistiques	48
III. Résultats	48

1. Essais <i>in-vitro</i>	48
1.1. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1 sur la germination des graines de <i>X. strumarium</i> et de <i>S. oleraceus</i> , respectivement.....	48
1.2. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3, S1 et C1 et de leurs formulations sur les feuilles détachées de <i>Xanthium strumarium</i> , <i>Sonchus oleraceus</i> et <i>Convolvulus arvensis</i> , respectivement.....	49
1.3. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolat C1 sur les feuilles détachées de <i>Convolvulus althaeoides</i> et sur la germination des graines de <i>Cuscuta campestris</i> Yunker	49
1.3.1. Effet d' <i>A. alternata</i> isolat C1 sur les feuilles détachées de <i>Convolvulus althaeoides</i>	49
1.3.2. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolat C1 sur la germination des graines de <i>Cuscuta campestris</i>	50
2. Essais <i>in-vivo</i>	50
2.1. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1, de leurs formulations et de l'herbicide Mustang® sur la croissance de <i>Xanthium strumarium</i> et de <i>Sonchus oleraceus</i> en pots.....	50
3. Essais <i>in-situ</i>	55
3.1. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1, de leurs formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance de <i>Xanthium strumarium</i> et de <i>Sonchus oleraceus</i> achamp.....	55
4. Gamme d'hôte.....	59
VI. Discussion	59
Chapitre IV. Évaluation du potentiel herbicide de trois isolats d'<i>Alternaria alternata</i> et de leurs formulations à l'égard de leurs adventices cibles.	
I. Introduction	62
II. Matériel et Méthodes	63
1. Obtention des métabolites secondaires	63
1.1 Cultures liquides.....	63
1.2. Filtration.....	63
1.3. Extraction et concentration des extraits organiques	63

1.4 Fractionnement des extraits bruts.....	64
1.4.1 Fractionnement des extraits bruts dans la colonne chromatographique	64
2. Méthode d'HPLC-MS utilisée pour l'identification des composants des filtrats de culture des trois isolats fongiques et de leurs fractions obtenues.....	65
3. Évaluation de l'effet des extraits bruts d' <i>A. alternata</i> isolats X3, S1 et C1 et de leurs fractions sur les feuilles détachées de leurs adventices cibles.....	66
4. Traitements statistiques	67
III. Résultats	67
1. Comparaison biochimique des trois isolats C1, S1 et X3 d' <i>Alternaria alternata</i>	67
1.1. Identification des métabolites par HPLC-MS.....	68
1.1.1. Composition biochimique des filtrats de cultures	68
1.1.2. Composition biochimique des fractions récupérées à partir des extraits bruts des filtrats de cultures des trois isolats d' <i>Alternaria alternata</i>	70
2. Effet des extraits bruts d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3, S1 et C1 et de leurs fractions sur les feuilles détachées des trois adventices cibles.	74
IV. Discussion	77
Conclusion générale et perspectives.....	80
Références bibliographiques.....	82

Liste des figures

Figure 1. Aspect de <i>Xanthium strumarim</i> L. (Asteraceae).	10
Figure 2. Aspect de <i>Sonchus oleraceus</i> L. (Asteraceae).....	14
Figure 3. Aspect de <i>Convolvulus arvensis</i> L. (Convolvulaceae).	18
Figure 4. Taches foliaires de <i>Xanthium strumarium</i> (a), <i>Sonchus oleraceus</i> (b) et <i>Convolvulus arvensis</i> (c) causées par l'isolat X3, S1 et C1 d' <i>Alternaria alternata</i> . a1, b1, c1 / Symptômes sur feuilles prélevées au champ, a2, b2, c2 / Croissance des colonies sur milieu PDA (faces supérieure et inférieure), a3, b3, c3 / Chainettes de conidies (Gr. × 100), a4, b4, c4 / Conidies (Gr. × 400). Échelle = 5 µm.	33
Figure 5. Granules d'alginate ; a/ avec les spores d' <i>Alternaria alternata</i> , b/ sans les spores d' <i>Alternaria alternata</i>	40
Figure 6. Dispositif expérimental. 1: Suspension de spores (S.S.), 2: Formulation liquide (F.L.), 3: Formulation solide (F.S.), 4: Témoin EDS, 5: Témoin F.L., 6: Témoin F.S., 7: Mustang Herbicide.	46
Figure 7. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3, S1 et C1 appliqués sous forme de suspension de spores (S.S.), de formulation liquide (F.L.) et de formulation solide (F.S.) sur les feuilles détachées de <i>Xanthium strumarium</i> , <i>Sonchus oleraceus</i> et <i>Convolvulus arvensis</i> comparativement à leurs témoins (Tém.) respectifs non inoculés.	49
Figure 8. Symptômes sur les feuilles des plantules de <i>Xanthium strumarium</i> commençant par l'apex et la périphérie, suite à l'inoculation par la suspension de spores d' <i>Alternaria alternata</i> isolat X3.	52
Figure 9. Symptômes sur les feuilles des plantules de <i>Sonchus oleraceus</i> suite à l'inoculation par la suspension de spores d' <i>Alternaria alternata</i> isolat S1.	53
Figure 10. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1 appliqués sous forme de suspension de spores (S.S.), de formulation liquide (F.L.), et de formulation solide (F.S.), sur les feuilles des plantules de <i>Xanthium strumarium</i> et de <i>Sonchus oleraceus</i> comparativement à leurs Témoins (Tém.) respectifs non inoculés.	53
Figure 11. Aspect des plantules et des racines de <i>Xanthium strumarium</i> après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins sont les plantules à droite de chaque photo et sont respectivement (de a à c) : Eau distillée stérile, Formulation liquide sans spores, Formulation solide sans spores.	54
Figure 12. Aspect des plantules de <i>Sonchus oleraceus</i> après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose	

réduite (d). Les témoins sont les plantules à droite de chaque photo et sont respectivement (de a à c) : Eau distillée stérile, Formulation liquide sans spores, Formulation solide sans spores.	54
Figure 13. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1 appliqués sous forme de suspension de spores (S.S.), de formulation liquide (F.L.) et de formulation solide (F.S.) sur les feuilles des plantules de <i>Xanthium strumarium</i> et de <i>Sonchus oleraceus</i> comparativement à leurs témoins (Tém.) respectifs non inoculés.	57
Figure 14. Aspect des plantules de <i>Xanthium strumarium</i> après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins (de e à g) sont : (e) Eau distillée stérile, (f) Formulation liquide sans spores, (g) Formulation solide sans spores.....	58
Figure 15. Aspect des plantules de <i>Sonchus oleraceus</i> après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins (de e à g) sont : (e) Eau distillée stérile, (f) Formulation liquide sans spores, (g) Formulation solide sans spores.	58
Figure 16. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des filtrats de culture des trois isolats d' <i>A. alternata</i> X3, S1 et C1.....	70
Figure 17. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des neuf fractions issues de l'extrait brut d' <i>Alternaria alternata</i> isolat C1.....	73
Figure 18. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des sept fractions issues de l'extrait brut d' <i>Alternaria alternata</i> isolat S1.....	73
Figure 19. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des huit fractions issues de l'extrait brut d' <i>Alternaria alternata</i> isolat X3.....	74
Figure 20. Effet de l'extrait brut et des fractions du filtrat de culture de l'isolat C1 sur les feuilles détachées de <i>Convolvulus arvensis</i> . E : Extrait, F. : Fraction, Tém.: Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth : Méthanol.	75
Figure 21. Aspect des feuilles détachées de <i>Convolvulus arvensis</i> après le traitement par l'extrait brut et les fractions du filtrat de culture de l'isolat C1 : d ₁ , e ₁ , h ₁ et i ₁ . E : Extrait, Frac : Fraction, Tém.: Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth. : Méthanol. La première rangée de photos représente les symptômes après un jour de traitement, la seconde représente les symptômes à la fin du test (4 jours après le traitement).	76
Figure 22. Effet de l'extrait brut et des fractions du filtrat de culture de l'isolat S1 sur les feuilles détachées de <i>Sonchus oleraceus</i> . E : Extrait, F. : Fraction, Tém.: Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth : Méthanol.	77

Figure 23. Aspect des feuilles détachées de *Sonchus oleraceus* après le traitement par l'extrait brut et les fractions a₂ et f₂. E : Extrait, F. : Fraction, Tém. : Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth : Méthanol.77

Liste des tableaux

Tableau 1. Nombre de graines par plant d'adventice et leur longévité.	5
Tableau 2. Exemple de mycoherbicides commercialisés et leurs adventices cibles.	8
Tableau 3. Séquences des amorces utilisées.	29
Tableau 4. Tableau comparatif des symptômes et des caractéristiques morphologiques et microscopiques des trois isolats d' <i>Alternaria alternata</i>	32
Tableau 5. Taux de similitude de chaque séquence des trois marqueurs génétiques des trois isolats fongiques avec les séquences des trois marqueurs génétiques de la souche type CBS 916.96.	34
Tableau 6. Numéros d'accèsion de chaque séquence des trois marqueurs génétiques ITS, rpb2 et gapdh des trois isolats fongiques.	34
Tableau 7. Températures et précipitations pendant les périodes des essais au champ.	44
Tableau 8. Les paramètres physico-chimiques du sol des parcelles expérimentales.	45
Tableau 9. Echelle de notation de la sévérité des attaques par <i>Alternaria alternata</i> et <i>Alternaria solani</i>	47
Tableau 10. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolats X3 et S1 sur le taux de germination de graines de <i>Sonchus oleraceus</i> et <i>Xanthium strumarium</i> , respectivement.	48
Tableau 11. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolat X3, ses formulations et l'herbicide Mustang® à dose réduite sur les plantules de <i>Xanthium strumarium</i> en pots.	51
Tableau 12. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolat S1, ses formulations et l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance des plantules de <i>Sonchus oleraceus</i> en pots.	52
Tableau 13. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolat X3, de ses formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance des plantules de <i>Xanthium strumarium</i> au champ.	56
Tableau 14. Effet d' <i>Alternaria alternata</i> isolat S1, de ses formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance des plantules de <i>Sonchus oleraceus</i> au champ. ...	56
Tableau 15. Proportions de solvants utilisées comme éluant dans le fractionnement des trois extraits bruts par la colonne chromatographique.	65
Tableau 16. Poids des extraits bruts et fractions des filtrats de cultures des trois isolats d' <i>Alternaria alternata</i>	68
Tableau 17. Les composants des filtrats de cultures des isolats C1, S1 et X3 d' <i>Alternaria alternata</i>	69
Tableau 18. Composants des fractions d' <i>Alternaria alternata</i> isolats C1, S1 et X3.	72

Liste des abréviations

ACR : Acrosin

ACT : Alpha 1-antichymotrypsin

ACTG : Tricycloalternarènes

ADN : Acide désoxyribonucléique

AK- : Adenylate Kinase

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CAB : Centre for Agriculture and Bioscience International

CBS : Central bureau voor Schimmel cultures

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CE : Conductivité Électrique

DAD : Diode Array Detectors

dNTP : désoxy Adénine Tri-Phosphate

dS : deci-Siemens

E. : Extrait

E : Est

EDS : Eau Distillée Stérile

ENSA : Ecole Nationale Supérieure agronomique

ESI : Ionisation par Électrospray

F. : Fraction

F.L. : Formulation liquide

F.S. : Formulation solide

Gapdh : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Gr. : Grossissement

HGT : Horizontal Gene Transfer

HPLC-MS : High pressure liquid Chromatography-mass spectrométry

HR : Humidité relative

HSTs : Host-specific toxins

ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures

ITS: Internal Transcribed Spacer

LC/MS : Liquid chromatography–mass spectrometry

Long. : Longitudinale

Méth. : Méthanol

MO : Matière organique

N : Nord

NCBI : National Center for Biotechnology Information

nHSTs : non Host-specific toxins

P : Probabilité

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

pH : Potentiel hydrogène

rpb2 : RNA polymerase II subunit 2

S.S. : Suspension de spores

S : Sud

SM : Spectromètre de Masse

SMTP-7 : Stachybotrys microspora Triphenyl Phenol-7

TeA : Aide ténuazonique

Tém. : Témoin

TR : Temps de rétention

Trans. : Transversale

USA : United State of America

UV : Ultraviolet

v : Volume

V : Volt

Avec l'augmentation de la population mondiale, la sécurité alimentaire est devenue l'ultime priorité de l'homme. En conséquence, maximaliser les rendements est devenu le principal objectif de l'agriculture moderne. Bien que cette approche arrive à satisfaire la demande de nourriture à un degré acceptable, elle a néanmoins, directement ou indirectement, un impact négatif sur la qualité sanitaire du produit, sur l'environnement ainsi que sur la santé de l'être humain, en raison de la panoplie de produits chimiques qu'elle implique (Bhadoria, 2011).

L'agriculture intensive moderne se caractérise par une demande élevée et continue d'approvisionnement en produits de haute qualité (Gamliel, 2010). L'expansion significative des systèmes de production visant le maintien de l'approvisionnement continu a eu pour conséquence une augmentation inévitable des dégâts dus à l'infestation par divers parasites (Gamliel, 2010). En plus des facteurs (abiotiques et biotiques) responsables de la diminution des rendements agricoles, les adventices contribuent à une perte de 45 % (Misra, 2005). Il y'aurait dans le monde environ 1800 espèces d'adventices ayant un impact économique négatif sur les cultures, 300 d'entre elles seraient considérées comme un véritable fléau pour l'agriculture (Doucet, 2013). Selon Misra (2005), 200 espèces d'adventices sont responsables de 95% de pertes économiques dues aux adventices dans le monde. Par ailleurs, les adventices représentent le tiers de toutes les pertes de production agricole réunies, ce qui représente une valeur de 150 milliards de dollars. Les dépenses utilisées pour lutter contre les adventices présentent 12 milliards de dollars à elles seules, l'équivalent de toutes les dépenses (insecticides, fongicides et autres) octroyées aux autres pesticides (Agrios, 2005).

En Algérie, les pertes en rendement dues à la présence des adventices dans les cultures de blé varient de 25 à 50 % selon les régions, les années, les espèces cultivées, les variétés et le degré d'infestation des systèmes de cultures (Hamadache, 2013 ; Fellah, 2017). Pour la culture de pois-chiche d'hiver (*Cicer arietinum* L.), les adventices et particulièrement *Sinapis arvensis* engendrent une réduction de gousses de 72 % et une perte de rendement de 76,4 % (Melakhessou, 2007).

Toutes ces caractéristiques rendent difficile l'élimination de ces plantes nuisibles et leur gestion devient comme le plus grand défi à l'adoption d'une agriculture durable (Bajwa, 2014). L'indisponibilité et le coût de la main d'œuvre et l'insuffisance de la force mécanique de sarclage obligent les agriculteurs à appliquer des herbicides chimiques ou à abandonner carrément leurs cultures et accepter les pertes (Misra, 2005).

Les herbicides produits depuis la fin de la deuxième guerre mondiale sont en grande partie responsables de la bonne productivité agricole (Boyette et al., 1996). Au cours des 50 dernières années, la protection des rendements s'est fondée fortement sur les pesticides chimiques (Chandler et al., 2011). La lutte contre les adventices est habituellement faite par l'emploi des produits chimiques du fait de leur efficacité à l'égard de la plupart d'entre elles, malheureusement, ces produits ont des effets néfastes sur l'homme et l'animal (Evidente et al., 1998 ; Zargar et al., 2016), ils polluent l'environnement et dans certains cas leur utilisation répétée provoque la résistance chez les adventices (Abbas & Barrentine, 1995 ; Asif et al., 2014). La tolérance des adventices vivaces aux herbicides et la non sélectivité de ces derniers s'ajoutent aux problèmes précités (Evidente et al., 2009 ; 2011). De surcroît, la présence des résidus des herbicides sur le feuillage des cultures devient un vrai problème dans la gestion des adventices (Wilson, 2016), par conséquent, la recherche de méthodes alternatives de lutte devient nécessaire (Chandler et al., 2011). Par ailleurs, la lutte biologique constitue une alternative prometteuse à utiliser en agriculture (Défago et al., 2001). Cette lutte a l'avantage d'être entièrement compatible avec l'environnement par sa spécificité élevée, sa longévité et aussi par sa capacité à détruire les adventices résistantes aux herbicides chimiques (Evidente et al., 1998 ; 2009).

L'une des stratégies les plus efficaces pour la gestion des adventices est le contrôle biologique avec les champignons phytopathogènes (Boyette et al., 1996). L'utilisation des champignons phytopathogènes dans la gestion des adventices représente un moyen innovateur qui peut contribuer au développement des agroécosystèmes (Stubbs & Kennedy, 2012 ; Adetunji et al., 2017). Selon Charudattan (2001), la lutte biologique par l'utilisation des champignons phytopathogènes a acquis une bonne réputation comme pratique car elle est bénéfique pour l'environnement et applicable aux agroécosystèmes. Les mycoherbicides ont pour but de résoudre le problème de la résistance aux herbicides, de réduire le coût de la production et d'augmenter le rendement (Cai & Gu, 2016). Les qualités d'un mycoherbicide sont : sa longévité, son application facile, son efficacité et son coût réduit (Bailey et al., 1997 ; Auld et al., 2003). En outre, certains champignons ont la capacité de produire des métabolites secondaires qui peuvent être utilisés pour lutter contre les adventices (Frisvad et al., 2008).

Puisque les mycoherbicides sont des organismes vivants, ils sont fortement influencés par les conditions environnementales (Boyette et al., 1996). Ils ont besoin particulièrement de longues périodes d'humidité afin que les spores puissent germer, pénétrer et infecter les adventices cibles (Boyette et al., 1996 ; Babu et al., 2003), d'où la nécessité de formulations adéquates. L'objectif principal des formulations des bioherbicides, qui peuvent se présenter

sous forme liquide ou solide, est de diminuer la dépendance des organismes à l'humidité (Auld et al., 2003).

Objectifs du travail :

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'approche mycoherbicide de lutte contre les adventices et vise les objectifs spécifiques suivants :

- Recherche des maladies dominantes sévissant sur trois des adventices des plus redoutables en Algérie, à savoir *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis* par des prospections au niveau de la station expérimentale et la ferme centrale de l'ENSA, ainsi que la station expérimentale de l'ITCG de Oued Semar.
- l'isolement des champignons présentant le symptôme dominant sur ces trois adventices.
- la vérification du postulat de Koch.
- la sélection des isolats fongiques isolés.
- la caractérisation morphologique et moléculaire des isolats fongiques sélectionnés.
- l'évaluation du potentiel mycoherbicide des isolats fongiques sélectionnés à l'égard de leurs adventices cibles.
- l'extraction et l'identification des métabolites secondaires produits par les isolats fongiques sélectionnés.
- l'évaluation du potentiel herbicide des extraits bruts et de leurs fractions à l'égard des adventices cibles.

Pour répondre à ces objectifs, ce travail, préparé dans le cadre d'une thèse de doctorat est subdivisé en introduction générale et quatre chapitres. Le premier concerne des données bibliographiques récentes sur le sujet et se subdivise en deux volets : le 1^{er} présente des généralités sur les adventices et leur importance dans le monde et en Algérie, ainsi que sur la notion de mycoherbicides. Le second volet présente les trois adventices étudiées (*Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis*) ainsi que le champignon *Alternaria alternata* (Fries.) Kiessler. Le deuxième chapitre, porte sur l'identification morphologique et moléculaire des trois isolats d'*A. alternata*. Le troisième porte sur l'évaluation du potentiel herbicide des suspensions de spores des trois isolats fongiques d'*A. alternata*, de leurs formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite à l'égard des adventices étudiées. Le quatrième et dernier chapitre porte sur l'évaluation du potentiel herbicide des extraits bruts et fractions des trois isolats fongiques d'*A. alternata* à l'égard de *X. strumarium*, de *S. oleraceus* et de *C. arvensis*. Enfin, une conclusion générale récapitule l'essentiel des résultats et présente les perspectives pour les recherches ultérieures.

1. Généralités sur les adventices et notion de mycoherbicide

1.1. Biologie des adventices

La flore adventice est étroitement liée aux modifications que l'homme a provoquées. En effet, cette flore, comme son nom l'indique est étrangère aux lieux où elle s'installe (Abdelkrim, 1995).

Les adventices ont trois modes de vie : annuelles, bisannuelles et vivaces, ces dernières étant les plus redoutables ; elles repoussent année après année et peuvent se reproduire végétativement par des organes de réserve (les racines, les rhizomes, les tubercules, les stolons ou les tiges souterraines) qui leur permettent de repousser après la destruction de leurs parties végétales aériennes (Caussanel, 1989 ; McCully et al., 2004 ; Weill & Duval, 2009).

1.2. Principales caractéristiques des adventices

Les adventices sont en continuelle compétition avec les cultures pour les nutriments, l'humidité du sol, les radiations solaires et l'espace. Elles peuvent aussi constituer un hôte alternatif pour les insectes et les maladies (Asif et al., 2014 ; Mishra et al., 2016). De surcroît, les adventices sont caractérisées par une croissance rapide qui leur permet d'affecter la croissance des cultures et la qualité du rendement, en épuisant les nutriments et l'eau destinés aux cultures, ainsi que par leur capacité à diffuser des substances chimiques qui peuvent interférer avec la croissance de ces dernières (Cai & Gu, 2016). Ces médiateurs chimiques sont principalement des métabolites secondaires (terpènes, alcaloïdes, molécules aromatiques...) (Valantin-Morison et al., 2008). Les adventices ont la capacité de coloniser l'horizon travaillé (0 à 30 cm) et former un stock semencier qui est caractérisé par une longévité importante (Surault et al., 2012) (**Tableau 1**), la dormance est la principale caractéristique de la survie des semences d'adventices dans le sol et de ce fait, de l'infestation prolongée des cultures par les adventices (Chadoeuf-Hnnel, 1985).

Tableau 1. Nombre de graines par plant d’adventice et leur longévité.

Adventices	Mode de reproduction	Nombre de graines par pied	Longévité des graines
<i>Galium aparine</i>	Graines	50 à 3000	40 ans
<i>Avena sterilis</i>	Graines	500 à 2000	15 ans
<i>Papaver rhoeas</i>	Graines	50000 à 200000	40 ans
<i>Lolium multiflorum</i>	Graines	3000 à 20 000	/
<i>Veronica persica.</i>	Graines	1500 à 8000	10 ans
<i>Elytrigia repens</i>	Rhizomes et graines	Faible quantité de semences	4-10 ans
<i>Sonchus arvensis</i>	Rhizomes et graines	500 à 13000	5 ans
<i>Cirsium arvense</i>	Drageons	1500 à 5000	20 ans

Source : ACTA (2010) et Agricultures & territoires (2017)

1.3. Répartition géographique des adventices en Algérie

La distribution des espèces adventices est la conséquence des conditions pédoclimatiques, géomorphologiques et surtout du type d’entretien du sol, en Algérie, même le type de culture a un effet sur la distribution (Lonchamp & Barralis, 1988 ; Boudjedjou & Fenni, 2011).

Plusieurs études ont porté sur la distribution des adventices dans certaines régions algériennes. Les zones céréalières et leurs jachères dans le secteur Algérois comporte 168 espèces adventices telles que : *Bromus sterilis*, *Bromus macrostachys*, *Ammi visnaga*, *Adonis aestivalis*, *Convolvulus tricolor*, *Erodium triangulare*. Par contre, la zone des cultures pérennes (vigne et verger) et annuelles (navet, artichauts ...etc) est infestée principalement par : *Calendula suffruticosa*, *Arum italicum*, *Urtica urens*, *Urtica membranacea*, *Fumaria capreolata*, *Veronica arvensis* (Abdelkrim, 1995).

Selon une étude faite sur le secteur oranais par Kazi-Tani et al. (2010 a), la richesse de cette région est représentée par 425 espèces d’adventices, réparties sur trois sous-secteurs ; le sous-secteur de l’Atlas Tellien est celui qui héberge le lot le plus important avec 409 espèces, vient ensuite le sous-secteur des plaines littorales avec 400 espèces, puis en dernier celui des sahels littoraux avec 390 espèces. La totalité des espèces recensées sont des Angiospermes se rattachant à 51 familles botaniques et 217 genres différents dont les Asteraceae, les Fabaceae et les Poaceae dominant nettement la flore adventice oranaise.

Hannachi & Fenni (2013) ont recensé 120 espèces d'adventices dans la région de Batna, où les dicotylédones sont largement dominantes avec 98 espèces, soit 81,66 % des espèces. Les Asteraceae y sont majoritaires avec 23 espèces, soit 19,16 % de la flore adventice. Les monocotylédones, comportent 22 espèces, soit 18,33 % de la flore adventice, principalement représentées par les Poaceae qui comptent à elles seules 17 espèces, soit 14,16 % de la flore adventice.

Dans le travail de Boudjedjou & Fenni (2011) portant sur la caractérisation de la flore adventice des cultures maraîchères de la région de Jijel, 191 espèces d'adventices ont été observées et se répartissent en 44 familles et 111 genres. Les sept familles botaniques les mieux représentées sont les Asteraceae (16,23 %, 31 espèces), les Fabaceae (13,61 %, 26 espèces), les Poaceae (7,32 %, 14 espèces), les Brassicaceae (5,23 %, 10 espèces), les Geraniaceae (4,18 %, 8 espèces), les Polygonaceae (4,18 %, 8 espèces) et les Chenopodiaceae. La famille des Asteraceae est la famille botanique la plus importante en Algérie, puisqu'elle renferme 408 espèces réparties en 109 genres (Quezel & Santa, 1963).

1.4. Lutte biologique avec les champignons

Il existe deux approches de contrôle biologique avec les champignons à l'égard des adventices : 1) l'approche classique : selon laquelle l'agent pathogène (exotique) est introduit dans une population d'adventices afin de réduire leur distribution, cet agent doit être spécifique à l'hôte car son utilisation peut être limitée à certaines zones. 2) l'approche mycoherbicide : réalisée par l'application des champignons pathogènes (inoculation massive) sur les adventices hôtes en procédant avec les mêmes techniques et méthodes que celles des herbicides chimiques. Contrairement aux champignons généralement utilisés dans la lutte biologique classique, les agents pathogènes exploités comme mycoherbicides sont souvent indigènes à la région où ils sont utilisés et ne doivent pas être spécialement importés. Ces mycoherbicides peuvent être appliqués de plusieurs façons ; par pulvérisation aérienne, par application "en coupe et en pâte" ou en poudre appliquée sur le sol (Hasan & Ayres, 1990). Cette approche convient le mieux dans la lutte contre les adventices grâce à son efficacité rapide et élevée (Boyette et al., 1996).

1.5. Potentiel mycoherbicide

Plusieurs études ont montré l'efficacité des champignons à l'égard des adventices. Ainsi, Kadir et al. (2000) ont montré que le champignon *Dactylaria higginsii* (Luttrell) pouvait affecter le *Cyperus rotundus* et causer une mortalité proche de 100%. Une autre étude

faite par Evidente et al. (1998) a montré que l'application de pycnidiospores de *Ascochyta caulina* Lib. sur *Chenopodium album* (*Chenopodiaceae*) pouvait causer des nécroses sur les feuilles et la tige suivies d'un retard de croissance et la mort de la plante. Une souche d'*Ulocladium botrytis* Preuss, isolée à partir des tiges d'*Orobancha crenata* (*Orobanchaceae*), s'est montrée pathogène à l'égard de cette mauvaise herbe parasite (Müller-Stöver & Kroschel, 2005).

1.6. Formulation

La formulation permet d'augmenter la stabilité de l'activité biologique et perfectionner l'homogénéité du mycoherbicide pour une meilleure pulvérisation et une meilleure intégration dans le système de gestion (Boyette et al., 1996).

1.6.1. Formulation solide

les formulations solides offrent une meilleure protection vis à vis des conditions environnementales extrêmes, elles servent comme nutriment aux microorganismes, ce qui leur donne une longue longévité et diminue la possibilité de lessivage des spores (Boyette et al., 1996). Les formulations solides peuvent être préparées à base de plusieurs matières inertes telles que la semoule, le kaolin et l'alginate (Connick et al., 1991 ; Shabana et al., 2003 ; Kinay & Yildiz, 2007).

1.6.2. Formulation liquide

Les formulations liquides dont les matières actives sont incorporées dans des huiles végétales ou minérales (Klein et al., 1995) ont pour rôle l'initiation rapide de l'infection (Boyette et al., 1996). L'huile offre une résistance à la dessiccation à court terme, ce qui est un aspect important de l'aptitude d'un organisme à se multiplier dans un champ (El-Morsy et al., 2006). On pense également que l'huile fournit une grande dispersion de l'inoculum sur la surface foliaire et exerce un effet sur la cuticule (suppression des éliciteurs de défense des plantes) (Amsellem et al., 1991).

1.7. Commercialisation des mycoherbicides

La commercialisation des biopesticides en général, représente une partie infime du marché mondial des produits phytosanitaires avec un montant de 3 milliards de dollars, soit l'équivalent de 5 % du marché mondial (Damalas & Koutroubas, 2018). Selon Bailey & Falk (2011), plusieurs travaux ont été réalisés sur les bioherbicides et leurs potentiels mais seulement 8,1 % ont atteint le stade de la commercialisation (**Tableau 2**). Ainsi, seulement 15 produits mycoherbicides ont été commercialisés dans le monde (Ash, 2010). Selon

Charudattan (2001), les bioherbicides commercialisés n'ont été utilisés qu'à une échelle réduite (quelques hectares, dans quelques pays).

Tableau 2. Exemple de mycoherbicides commercialisés et leurs adventices cibles.

Adventice Cible	Agent de lutte	Nom commercial	Culture cible	Pays	Références
<i>Aeschynomene virginica</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i>	Collego	Riz et soja	USA	TeBeest & Templeton, 1985.
<i>Morrenia odorata</i>	<i>Phytophthora palmivora</i>	DeVine	Citrus	USA	TeBeest & Templeton, 1985.
<i>Malva pusilla</i> et <i>Malva</i> spp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>malvae</i>	BioMal	Plusieurs cultures	USA; Canada	Singh et al., 2006
<i>Cyperus esculentus</i>	<i>Puccinia canaliculata</i>	Dr. BioSedge	Plusieurs cultures	USA	Hajek, 2004.
Adventices ligneuses	<i>Chondrostereum purpureum</i>	BioChon	verger	Hollande	Singh et al., 2006
<i>Hakea sericea</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Hakatak	Espace non cultivé	USA	Singh et al., 2006

2. Données sur les adventices et champignons étudiés

2.1. Les adventices étudiées

2.1.1. *Xanthium strumarium* L.

Xanthium strumarium appartient à la famille des Asteracées qui comprend 1600 à 1700 genres et 24000 espèces cosmopolites. Les espèces de *Xanthium* sont autochtones de la région méditerranéenne (Bozic et al., 2013), parmi lesquelles *X. strumarium* est la plus redoutable dans les agrosystèmes (Zhu et al., 2011).

2.1.1.1. Position systématique

a. Classification classique

Selon Doucet (2013), la position taxonomique de cette espèce est comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Dicotylédones

Classe : Sympétalées

Ordre : Astérales

Famille : Astéraceae

Genre : *Xanthium*

Espèce : *Xanthium strumarium* L.

b. Classification phylogéniques

La classification phylogénique positionne *X. strumarium* comme suit (Selosse, 2013) :

Clade : Eukaryota

Clade : Viridiplantae

Clade : Streptophyta

Clade : Tracheophyta

Clade : Euphyllophyta

Clade : Spermatophyta

Clade : Eudicotyledones

Clade : Asteridae

Clade : Campanulidae

2.1.1.2. Description botanique et biologique

Selon Doucet (2013), *X. strumarium*, appelé communément « la lampourde glouteron », est une annuelle d'été de grande taille (30 à 150 cm). Elle regroupe plus d'une vingtaine de populations. La tige dressée est souvent très ramifiée, rugueuses, tachetées de pourpre, surtout chez les grandes plantes ; elle se propage par la graine. A la base du plant se trouvent deux cotylédons persistants, même chez les plantes matures, longs, étroits et lisses. La floraison s'étale d'août à octobre. La fleur mâle de la lampourde est minuscule en épis éphémère et brune à la fructification, la fleur femelle de forme ovoïde, hérissée et de couleur verte, se présente en bouquets axillaires à l'aisselle des feuilles (**Figure 1**) (Weaver & Lechowicz, 1982 ; Doucet, 2013).

Xanthium strumarium se reconnaît par ses larges feuilles concolores, rugueuses, vertes, simplement dentés et ses fruits sous forme de capsules formées à partir de l'involucre (Jauzein, 2011). La capsule est terminée par deux aiguillons à crochets très durs, elle contient deux graines, l'une plus petite que l'autre. La paroi de la capsule épaisse et hermétique (5 à 7 mm) et doit se dégrader et s'user afin de permettre à l'oxygène d'y pénétrer et permettre ainsi à la graine, qui réussit à en capter le plus, de germer ; l'autre graine doit attendre l'année suivante pour germer. C'est ce qui rend la plante difficile à éradiquer (Doucet, 2013). Cette adventice à une dormance potentielle dont la germination se produit dans la deuxième saison de croissance (Abbas et al., 1999).



Figure 1. Aspect de *Xanthium strumarim* L. (Asteraceae).

2.1.1.3. Caractères écologiques

La lampourde est une espèce subméditerranéenne, originaire de l'Amérique du nord, elle est assez rare mais on la rencontre dans des climats et des sols différents (lourds ou légers, acides, neutres ou basiques) et même dans les sols humides (Mamarot & Rodriguez, 2011; DiTomaso et al., 2013). Difficile à détruire et très concurrentielle, elle peut être abondante localement, elle colonise toutes les cultures estivales (Mamarot & Rodriguez, 2011).

2.1.1.4. Distribution géographique

Xanthium strumarium s'étend entre la latitude 53 °N et la latitude 33 °S (Love & Dansereau, 1959), dans les zones tempérées, subtropicale et méditerranéennes (Weaver & Lechowicz, 1982). Elle se rencontre dans différents types de milieux : les régions pastorales, les bords des routes, le long des berges des rivières, sur les dunes côtières et sur les marges forestières (Love & Dansereau, 1959 ; DiTomaso et al., 2013 ; Haroun et al., 2015). En Algérie, cette plante est particulièrement répandue, à titre d'exemple elle se trouve à Taref, Jijel, Sétif, Béjaya, Tizi-Ouzou et dans le secteur Oranais (Quezel & Santa, 1963 ; Benhamiche-Hanifi & Riadh Moulai, 2012 ; Kazi-Tani et al., 2012 ; Hamel & Azzouz, 2018 ; Guemaz et al., 2018 ; Dib & Sadoudi Ali Ahmed, 2020).

2.1.1.5. Cultures infestées

Le sésame, le coton, le soja, l'arachide, le tournesol, le maïs et la vigne sont parmi les cultures les plus infestées par cette adventice (Royal et al., 1997 ; Bukun, 2011 ; Hussain et al., 2011 ; Bozic et al., 2013).

2.1.1.6. Nuisibilité de *Xanthium strumarium*

a. Nuisibilité primaire

a.1. Nuisibilité directe

a.1.1. Compétition

Xanthium strumarium est généralement hautement compétitive aux plantes cultivées à l'égard de la lumière et de l'humidité (Bozic et al., 2013). Une étude faite par Bukun (2011) montre que le rendement du sésame, *Sesamum indicum*, est fortement réduit par l'augmentation de la densité de cette plante. Elle s'est également avérée très concurrentielle dans les cultures de coton et de soja et représente un problème sérieux pour l'arachide. Une autre étude faite par Royal et al. (1997) a montré l'impact de la densité de *X. strumarium* sur la production d'arachide. La réduction du rendement d'arachide était de 0 à 88 % pour des

densités de *X. strumarium* allant de 0 à 32 plantes par ligne de culture d'arachide (sur 8 m), respectivement (Royal et al., 1997). Une troisième étude a montré la capacité de cette adventice à diminuer la densité, la biomasse et l'indice de la surface foliaire du maïs fourragé par la compétition (Hussain et al., 2011). Enfin, d'après Bozsa & Oliver (1990), les racines de la lampourde sont plus concurrentielles que celles du soja en affectant le poids sec de la partie aérienne de la culture.

a.1.2. Allélopathie

Selon Benyas et al. (2010), *X. strumarium* a un effet allélopathique sur la germination des graines, la croissance des plantules et le poids sec de la lentille. Pareillement, un effet allélopathique négatif de cette plante a été démontré sur la germination des graines du blé, de l'orge, de l'avoine et sur l'émergence des plantules de le haricot, du poivron, de la courge, de l'oignon et du pois chiche (Kadioglu, 2004).

a.2. Nuisibilité indirecte

Xanthium strumarium sert de réservoir et d'hôte alternatif à un certain nombre de bio-agresseur attaquant un large éventail de cultures tels que *Spilosoma obliqua*, Mungbean yellow mosaic virus, *Plasmopara halstedii* (Nene et al., 1971 ; Dhaliwal, 1993 ; Haroun et al., 2015 ; Agricultures & territoires, 2019). De surcroit, *X. strumarium* décline certaines cultures d'été car cette plante est toxique pour les animaux et l'Homme (Agricultures & territoires, 2016).

b. Nuisibilité secondaire

b.1. Stock semencier

Xanthium strumarium peut produire de 500 à 5000 graines par plant (Agricultures & territoires, 2016). Le fruit contient deux graines (Doucet, 2013), mais il existe des biotypes contenant 25 graines par fruit et donnant jusqu'à neuf jeunes plantes, rendant le contrôle de cette adventice plus difficile (Abbas et al., 1999).

2.1.2. *Sonchus oleraceus* L.

Sonchus oleraceus appartient à la famille des Asteracées, le genre *Sonchus* comprend 50 espèces réparties en Euroasie, autour de l'Afrique méditerranéenne et tropicale (Joshi & Poudel, 2011). *Sonchus oleraceus* est considéré comme une adventice nuisible dans le monde entier (Lee et al., 2005).

2.1.2.1. Position systématique

a. Classification classique

Selon Doucet (2013), la position taxonomique de *S. oleraceus* est comme suit :

Règne : Plantae

Superdivision : Spermatophyta

Division : Dicotylédones

Classe : Sympétalées

Ordre : Astérales

Famille : Astéraceae

Genre : *Sonchus*

Espèce : *Sonchus oleraceus* L.

b. Classification phylogénique

Selon Selosse (2013), la classification phylogénique de *S. oleraceus* est comme suit :

Clade : Eukaryota

Clade : Viridiplantae

Clade : Streptophyta

Clade : Tracheophyta

Clade : Euphyllophyta

Clade : Spermatophyta

Clade : Eudicotyledones

Clade : Asteridae

Clade : Campanulidae

2.1.2.2. Description botanique et biologique

Sonchus oleraceus, appelé communément le laitron maraîcher, est une plante annuelle naturalisée d'Europe, c'est le lait blanchâtre qui s'écoule de la plantule brisées qui lui vaut le nom de laitron. Cette adventice à racine pivotante à une tige de 30 à 120 cm de hauteur, elle se propage par des graines, à germination printanière ou estivale, rougeâtres ou brunes, côtelées, ridées transversalement et couronnées d'une aigrette blanche à soies simples. Elle est pourvue de latex et de poils glandulaires sur les parties supérieures des tiges. Toutes ses fleurs sont ligulées et de couleur jaune pale. Elles fleurissent de Juin à fin Septembre (Mamarot & Rodreguez, 2011).

La plantule a des feuilles alternes, disposées en rosette et de couleur vert clair à vert bleuté. Les feuilles cotylédonaires du laitron sont de taille moyenne (9-14 mm x 4-6 mm), à limbe arrondi à ovale-arrondi, à sommet un peu tronqué et échancré et à pétiole bien distinct (3-6 mm). Les 2 premières vraies feuilles ont un limbe faiblement denté, ovale à elliptique qui s'atténue en un long pétiole étroitement foliacé. La base du limbe de la troisième feuille s'incurve brutalement et perpendiculairement sur le pétiole amplement foliacé, les feuilles suivantes obovales allongées sont profondément divisées en segments dentés dont les latéraux aplanis ou peu redressés s'étagent sur l'axe foliaire, le segment terminal est triangulaire et de plus grande taille que les latéraux. Les jeunes feuilles sont recouvertes de poils blanchâtres multicellulaires qui disparaîtront rapidement, excepté à la base des pétioles où ils se maintiennent plus durablement, les feuilles du bas sont pétiolées, les autres sont sessiles et ont des expansions latérales (oreillettes) pointues à la base des feuilles (**Figure 2**) (Mamarot & Rodreguez, 2011).



Figure 2. Aspect de *Sonchus oleraceus* L. (Asteraceae).

2.1.2.3. Caractères écologiques

Sonchus oleraceus tolère plusieurs types de sols avec une préférence pour les sols nitrophiles (ITGC, 1976 ; Doucet, 2013). Cette espèce est favorisée par un milieu humide, par conséquent, la germination sur le terrain suit généralement des précipitations importantes à n'importe quel moment de l'année mais peuvent germer dans une large gamme de températures (5 à 35 °C) (Chauhan et al., 2015).

2.1.2.4. Distribution géographique

Sonchus oleraceus est une adventice cosmopolite dont la répartition géographique s'étend entre les latitudes 70 °N et 50 °S, il se trouve dans les zones perturbées par l'homme tel que les bords de routes, les terres cultivées, les gravières et les zones de surpâturage (Hutchinson et al., 1984).

Plusieurs études ont montré la présence remarquable et la grande distribution de *S. oleraceus* dans les cultures céréalières et légumineuses dans différentes régions en Algérie (Guelma, Taref, Sétif, Tlemcen, Sidi Bel Abbes, Oran, Mostaganem, Mascara, Chlef, le nord de Tiaret et celui de Saida) (Kazi-Tani et al., 2010 b ; Hamel & Azzouz, 2018 ; Nedjar & Ben Loucif, 2018 ; Oudina, 2018).

2.1.2.5. Cultures infestées

Le laiteron maraîcher se rencontre dans les champs de pois-chiches, d'haricot et des grandes cultures, plus particulièrement ceux de colza et de céréales (ITGC, 1976 ; Qasem, 1992 ; Cici et al., 2008 ; Doucet, 2013).

2.1.2.6. Nuisibilité du *Sonchus oleraceus*

a. Nuisibilité primaire

a.1. Nuisibilité directe

a.1.1. Allelopathie

Sonchus oleraceus a un grand potentiel allelopathique grâce à la présence des composés phénoliques; acide cafféique et cathécol (Hassan et al., 2014).

a.2. Nuisibilité indirecte

Sonchus oleraceus est un hôte secondaire de plusieurs prédateurs tels que les aphides (*Uroleucon sonchi*, *Hyperomyzus lactucae*), les nématodes (*Patylenchus penetrans*) et les lépidoptères (*Helicoverpa armigera*) (Manuel et al., 1980 ; Gu & Walter, 1999 ; Ben Halima et al., 2012 ; Laamari et al., 2012). Ces nématode et ces aphides sont des vecteurs de plusieurs virus parmi lesquels on peut citer : le Sowthistle yellow vein virus (SYVV), le beet yellow stunt virus (BYSV) et le Beet western yellows virus (BWYV) (Wallis, 1967 ; Duffus, 1971).

b. Nuisibilité secondaire

Sonchus oleraceus produit une grande quantité de graines. Ainsi, un plant peut en produire 8000 jusqu'à 25000, ce qui lui vaut sa grande dissémination et son grand stock semencier. Ses graines peuvent avoir une germination de plus de 90 % et contaminent les récoltes des cultures commercialisées (Hutchinson, 1984 ; Chauhan et al., 2006 ; Chauhan et al., 2015) .

2.1.3. *Convolvulus arvensis* L.

Convolvulus arvensis L. appartient à la famille des Convolvulaceae qui est représentée par des herbacés, des ligneux, des plantes rampantes, des arbustes et arbres. Les espèces de cette famille sont réparties dans les régions tempérées et tropicales (Abd El-Gawad et al., 2014). *C. arvensis* est une espèce autochtones de la méditerranée qui comporte au moins 84 noms communs, c'est l'une des adventices les plus nuisibles au monde (Austin, 2000).

2.1.3.1. Position systématique

a. Classification classique

Selon Doucet (2013), la position taxonomique de *C. arvensis* est comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Solanales

Famille : Convolvulaceae

Genre : *Convolvulus*

Espèce : *Convolvulus arvensis* L.

b. Classification phylogéniques

La classification phylogénique positionne *C. arvensis* comme suit (Selosse, 2013) :

Clade : Eukaryota

Clade : Viridiplantae

Clade : Streptophyta

Clade : Tracheophyta

Clade : Euphyllophyta

Clade : Spermatophyta

Clade : Eudicotyledones

Clade : Asteridae

Clade : Lamiidae

2.1.3.2. Description botanique et biologique

Convolvulus arvensis, appelé communément «liseron des champs», est originaire d'Europe (DiTomaso et al., 2013). En Méditerranée, sa germination printanière fréquente, a lieu dès que les températures moyennes atteignent 12 à 13 °C. Selon Mamarot & Rodriguez (2011), *C. arvensis*, est une vivace pourvue de drageons. La plantule a une tige et des feuilles alternes. L'axe hypocotyle, épais, souvent brun rougeâtre, peut atteindre 2 cm. Les cotylédons, assez grands (18 à 22 mm × 8 à 10 mm), ont un limbe quadrangulaire parcouru de fines nervures pennées.

Les premières feuilles sont ovales, à sommet arrondi ou quelquefois aigues, échancrées à la base et se terminant par deux lobes aigus. Les feuilles suivantes sont caractéristiques de l'espèce, elles sont alternes et à nervation pennées. Le limbe est porté par un pétiole canaliculaire, à pilosité faible. Les feuilles ont un sommet obtus, aigu et apiculé. La tige (1,5 à 2 m) est très ramifiée, prostrée ou volubile et anguleuse, vrillée sur elle-même et discrètement pubescente dans sa partie distale (**Figure 3**).

La floraison s'étend de mai à octobre sous les conditions méditerranéennes. Les fleurs, blanches ou roses ou mêlées de blanc et de rose, solitaires ou géminées, de 2 à 3 cm, sont en forme d'entonnoir. Elles sont portées par des pédoncules munies en leur milieu de deux petites bractées linéaires.



Figure 3. Aspect de *Convolvulus arvensis* L. (Convolvulaceae).

2.1.3.3. Caractères écologiques

Le liseron des champs est une espèce mésoxérophile, présente sur tous les types de sols ; elle est plus fréquente sur ceux bien drainés, à pH basique ou neutre. Cette adventice colonise toutes les cultures mais surtout celles à cycle estival, qu'elles soient annuelles ou pérennes. Elle s'accommode bien aux sols secs, chauds et souvent peu fertiles. Elle est tout à la fois nuisible par compétition, gênante pour les cultures, voire par les phénomènes allélopathiques (Mamarot & Rodriguez, 2011).

2.1.3.4. Distribution géographique

Le liseron des champs pousse dans les régions tempérées, on le trouve aux États Unis et au Canada (DiTomaso et al., 2013). En Algérie, *C. arvensis* est partout dans le secteur numidien (la Calle), dans le secteur du Tell constantinois (constantinois au Djebel Ouahch) et dans le sous-secteur littorale (Mitidja) (Quezel & Santa, 1963). Plusieurs études ont montré la présence de *C. arvensis* dans plusieurs cultures (céréales, oliveraies, vergers d'agrumes et de fruits, vignobles) et dans différentes régions d'Algérie (*Sidi Bel Abbès, Oran, Annaba, Skikda*) avec un recouvrement très élevée (Fertout-Mouri, 2018 ; Hanitet, 2012 ; Hamel & Boulemtafes, 2017).

Selon Kazi-Tani et al. (2010 b), le *convolvulus arvensis* est considéré comme l'une des adventices les plus nuisibles du secteur oranais (Tlemcen, Sidi Bel Abbes, Oran, Mostaganem, Mascara, Chlef, le nord de Tiaret et de Saida) pouvant coloniser pratiquement

tous les milieux écologiques (espèce très fréquente), sa grande adaptation à l'environnement agricole lui confère un potentiel d'envahissement des parcelles très important (espèce très abondante).

2.1.3.5. Cultures infestées

Convolvulus arvensis est une adventice vivace difficile à gérer surtout dans les cultures annuelles (tomate, haricot, courgette, melon, luzerne, blé, maïs et sorgho), dans les vergers, les vignobles et les zones pastorales. Il se trouve aussi aux bords des routes et sur les rives des lacs (Schweizer et al., 1978 ; Packer & Krall, 1989 ; Heering & Peeper, 1991 ; Boydston & Williams, 2004 ; Abd El-Gawad et al., 2014). La densité de *C. arvensis* est conditionnée par la culture. En général, sa densité est plus élevée dans les champs de blés (Jurado-Expósito et al., 2004).

2.1.3.6. Nuisibilité de *Convolvulus arvensis*

a. Nuisibilité primaire

a.1. Nuisibilité directe

a.1.1. Compétition

La croissance rapide de *C. arvensis* lui permet de couvrir les jeunes plantules et les étouffer ce qui entraîne une diminution de rendement (Balicevic et al., 2014). Cette adventice a des capacités concurrentielles dues en grande partie à son système étendu de racines et à sa tolérance aux conditions environnementales. La concurrence de *C. arvensis* réduit considérablement le poids frais et sec de la tomate ainsi que sa teneur en NPK (Kazinczi et al., 2007 ; Abd El-Gawad et al., 2014).

a.1.2. Allélopathie

Balicevic et al. (2014) ont démontré un effet allélopathique de *C. arvensis* sur la germination des graines de tomate.

a.2. Nuisibilité indirecte

Les produits chimiques efficaces contre le liseron des champs peuvent souvent affecter beaucoup d'autres plantes cultivées, ce qui pose des problèmes écologiques (Défago et al., 2001). Le désherbage chimique printanier paraît particulièrement favoriser cette espèce vivace (Boudjedjou & Fenni, 2011).

b. Nuisibilité secondaire

b.1. Stock semencier

Convolvulus arvensis représente un sérieux problème dans les communautés des plantes par sa haute capacité de régénération. Les rhizomes et les racines détachées ont un grand potentiel de production représenté par un large nombre de nouvelles racines (Abd El-Gawad et al., 2014). La profondeur de son enracinement, jusqu'à 2 m, lui permet de ne pas être (ou très peu) affecté par les herbicides à action racinaire, qui agissent habituellement à la surface ou dans les couches superficielles du sol (Boudjedjou & Fenni, 2011).

Le grand nombre de graines produites et leur longévité lui offre sa grande dispersion et sa persistance (Abd El-Gawad et al., 2014). Les graines deviennent mûres environ 3 semaines après la floraison, elles peuvent germer dans les 10 jours qui suivent la maturation. Les graines du liseron des champs ont un tégument dur et imperméable qui leur permet de rester dormantes, mais viables dans le sol pendant de nombreuses années, un seul plant peut produire jusqu'à 500 graines dont la durée de vie peut atteindre 50 ans (Morishita et al., 2005 ; Schaub, 2010).

2.2. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

2.2.1. Généralités sur les *Alternaria*

Le genre *Alternaria* contient approximativement 100 espèces réparties dans le monde entier dans des zones agro-climatiques et écosystèmes différents. Les *Alternaria* peuvent être des endophytes, des saprophytes ou des phytopathogènes (Lou et al., 2013 ; Meena et al., 2017 a) comme ils peuvent être associés à une grande variété de substrats, notamment les semences, les plantes, les produits agricoles, les animaux, le sol et l'atmosphère (Saharan et al., 2016).

La majorité des espèces d'*Alternaria* sont totalement dépourvues de sexualités mais certaines ont une reproduction sexuée dans leur cycle de vie (Mamgain et al., 2013).

Plusieurs espèces d'*Alternaria* sont connues par leur production de toxines spécifiques (AAL, AK-, AM-, AF-, ACR- et ACT-) et non spécifiques (brefeldin A, acide tenuazonique, tentoxin et zinniol) qui tuent les cellules hôtes des plantes et en affectent plusieurs fonctions physiologiques de leurs structures cellulaires (mitochondries, chloroplastes, complexe de Golgi, membrane plasmique....) (Akamatsu, 2004 ; Lou et al., 2013 ; Nagrale et al., 2016 ; Meena et al., 2017).

Plusieurs souches d'*A. alternata* sont saprophytes mais certaines sont nécrotrophes et causent des maladies sévères chez les plantes (Salamiah et al., 2001 a). *Alternaria alternata* est un champignon pathogène capable de synthétiser la mélanine (rôle protecteur) et les toxines spécifiques et non spécifiques (Thomma, 2003 ; Kheder et al., 2012 ; Wojciechowska et al., 2014). Les toxines spécifiques de cette espèce sont considérées comme un facteur déterminant de la pathogénicité et de la virulence (Salamiah et al., 2001 b), Les toxines non spécifiques à l'hôte ont des effets phytotoxiques relativement faibles, ils affectent un large spectre d'espèces végétales et sont considérées comme un facteur supplémentaire de pathogénicité en plus des mécanismes de pénétration et des processus enzymatiques (Meena et al., 2017). Les symptômes causés par cette espèce dépendent essentiellement des conditions d'humidité, de l'hôte et des variétés (Malandrakis et al., 2015).

2.2.2. Position systématique

Selon Mamgain et al. (2013), la position systématique d'*A. alternata* est comme suit :

Règne : Fungi

Phylum : Ascomycota

Sous-phylum : Pezizomycotina

Classe : Dothideomycetes

Ordere : Pleosporales

Famille : Pleosporaceae

Genre : *Alternaria*

Espèce : *A. alternata* (Fr) Keissl.

2.2.3. Biologie des *Alternaria*

Le genre *Alternaria* est caractérisé par la formation de conidies pigmentées multicellulaires polymorphes, isolées ou en chaînes courtes ou longues, les conidies sont dictyospores, elles sont plus larges près de la base et s'effilent progressivement pour former un bec plus ou moins long.

Les conidiophores de la majorité des espèces d'*Alternaria alternata* produisent des spores asexuées (conidies) mesurant entre 30 et 40 μm de longueur. Dans des conditions *in-vitro*, la sporulation se produit à une température comprise entre 8 et 24 °C et les spores matures apparaissent après 14 à 24 h. Les températures optimales se situent entre 16 et 24 °C avec un temps de sporulation compris entre 12 à 14 h (Mamgain et al., 2013).

2.2.4. Processus infectieux des *Alternaria*

Le processus infectieux mis en place par les champignons du genre *Alternaria* pour infecter leurs hôtes peut se dérouler en trois étapes: conservation, pénétration et invasion et enfin dissémination.

2.2.4.1. Conservation

Les champignons du genre *Alternaria* peuvent survivre longtemps sous forme de mycélium ou de spores sur des débris végétaux en décomposition, ou sous forme d'infection latente dans les graines (les semences attaquées peuvent constituer l'inoculum primaire). Ces champignons n'ont pas de spores hivernantes (Marchegay, 1990 ; Rotem, 1994).

2.2.4.2. Pénétration et invasion

Une fois les conidies en contact avec le tissu végétal (hôte), elles commencent à germer et à former des tubes germinatifs, cette étape est fortement influencée par les conditions environnementales (les conidies d'*Alternaria* germent dans une large gamme de températures, mais elles nécessitent un taux d'humidité élevé) (Hatzipapas et al., 2002).

La pénétration est assurée par les tubes germinatifs avec des appressoria à différents endroits de la surface de la feuille (pénétration directe). Cependant, la pénétration à travers les stomates et les blessures se fait par les tubes germinatifs sans appressoria (pénétration indirecte) (Gupta et al., 1998).

Le processus enzymatique lytique intervient aussi dans le mécanisme de pénétration à l'aide d'enzymes telles que la polygalacturonase, la pectine lyase, la pectine méthylestérase, cutinase, lipase et la cellulase (Hatzipapas et al., 2002 ; Thomma, 2003).

Les toxines interviennent aussi dans l'infection avec les toxines spécifiques à l'hôte (HST) et les toxines non spécifiques à l'hôte (nHST) (Hatzipapas et al., 2002).

2.2.4.3. Dissémination

La dissémination des spores se fait par le vent, l'eau, les outils et les animaux. *Alternaria* spp. peuvent survivre dans des adventices sensibles ou des cultures pérennes (Maude & Humpherson-Jones, 1980). Les résidus de cultures infectées laissées sur le sol après la récolte constituent également une source d'infection pour la majorité de ces champignons (Mamgain et al., 2016).

2.2.5. Métabolites produits par les *Alternaria*

Les métabolites produits par *Alternaria* spp. peuvent être regroupés en plusieurs catégories : les composés azotés, les stéroïdes, les terpénoïdes, les pyranones (pyrones), les quinones et les phénols. Plusieurs métabolites sont spécifiques à une espèce d'*Alternaria*, mais la plupart des métabolites sont produits par plusieurs espèces. Le métabolite le plus répandu est l'alternariol qui a été isolé de plusieurs espèces d'*Alternaria*. Certains métabolites ont également été isolés à partir d'autres genres de champignons et même de plantes supérieures. Les exemples typiques sont les toxines AAL provenant de *Fusarium*, acide helvolique d'*Aspergillus*, paclitaxel de l'if (*Taxus* spp.) (Saharan et al., 2016). La plupart des toxines spécifiques à l'hôte fongique sont des métabolites (Mamgain et al., 2013).

2.2.6. Potentiel mycoherbicide des *Alternaria*

Plusieurs espèces d'*Alternaria* ont été étudiées pour leur potentiel mycoherbicide à l'égard des adventices. L'étude de Abbas & Barrentine (1995) a confirmé que le *Xanthium strumarium* peut être contrôlé par *Alternaria helianthi*.

Une étude faite par Vurro et al. (1998) a montré que *Alternaria zinniae* est l'agent causal de nécroses du *Xanthium occidentale*, ces nécroses sont dues à la présence de deux métabolites toxiques ; le brefeldin A et le $\alpha\beta$ -dehydrocurvularin.

Dans les expérimentations de Saxena & Kumar (2007 ; 2010), *Alternaria alternata* a causé une mortalité de 100 % chez les plants de *Parthenium hysterophorus*, cette dernière est une adventice invasive considérée comme une menace pour l'agriculture.

Selon l'étude de Kaur & Aggarwal (2015), *Alternaria macrospora* peut être utilisé pour lutter contre *Parthenium hysterophorus*. *Alternaria sonchi* produit des mycotoxines (Alternethanoxins C-E) qui peuvent causer des dommages sur les feuilles de *Sonchus arvensis* (Berestetskiy et al., 2015).

I. Introduction

Les trois adventices étudiées, à savoir *Xanthium strumarium* L., *Sonchus oleraceus* L. et *Convolvulus arvensis* L. ont été rapportées comme étant des plantes hôtes de plusieurs espèces fongiques. Ainsi, plusieurs études ont montré que *X. strumarium* est l'hôte de plusieurs agents pathogènes tels que *Plasmopara angustiterminalis*, *Diaporthe helianthi* (Komjáti et al., 2007 ; Vrandecic et al., 2010). Concernant *S. oleraceus*, l'étude de Scott & McCarren (2012) a révélé la présence de 14 agents phytopathogènes associés à cette adventice dont le plus répondeur est *Miyagia pseudosphaeria*. De plus plusieurs travaux se sont focalisés sur le développement des mycoherbicides basés sur *Alternaria sonchi* et *Ascochyta sonchi* et l'identification de leurs métabolites secondaires (Cimmino et al., 2008 ; Evidente et al., 2009).

Convolvulus arvensis a fait également l'objet de plusieurs travaux tels que l'étude réalisée par Pfirter et al. (1997) qui a recensé 268 isolats fongiques appartenant à 28 genres dont les plus répondeurs sont *Phoma*, *Septoria*, *Stagonospora*, *Alternaria* et *Fusarium*.

Par ailleurs, différentes espèces fongiques du genre *Alternaria* ont été précédemment signalées sur plusieurs adventices des mêmes genres (Siddiqui et al., 2009 ; 2010). *Alternaria zinniae* et *A. hilianti* ont été signalés sur *Xanthium* spp. (Abbas & Barrentine, 1995 ; Vurro et al., 1998), *A. sonchi* et *A. alternata* sur *Sonchus* spp. (Elliott, 1916 ; Evidente et al., 2009 ; Zafari & Razaghi, 2013) et *A. brassicae* et *A. solani* sur *Convolvulus arvensis* (Saharan et al., 1982 ; Akhtar et al., 2011).

De nombreuses souches d'*Alternaria* spp. sont saprophytes mais certaines sont connues par leur pouvoir pathogène (Salamiah et al., 2001a ; Thomma, 2003). L'une des principales caractéristiques des espèces d'*Alternaria* est la production de mélanines et de toxines spécifiques à l'hôte dans le cas des espèces pathogènes. Les *Alternaria* sont des pathogènes foliaires qui causent la destruction des tissus de l'hôte entraînant la formation de lésions nécrotiques (Thomma, 2003). Les symptômes dépendent principalement des conditions climatiques, de la sensibilité de l'hôte et du cultivar (Malandrakis et al., 2015).

L'objectif de la présente étude est: i) d'isoler des champignons à partir de feuilles de *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis* présentant des symptômes d'attaque collectées de la station expérimentale et de la ferme centrale de l'ENSA, ainsi que de la station expérimentale de l'ITGC de Oued Semar à Alger, ii) d'identifier les principaux isolats fongiques par des analyses morphologiques et moléculaires et iii) de déterminer leur pathogénicité à l'égard des trois adventices dans des conditions contrôlées.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel utilisé

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce chapitre consiste en des plantules obtenues par semis de graines et des plantules ainsi que des feuilles détachées collectées de la station expérimentale de l'ENSA. (36°43'19.3"N, 3°08'58.6"E et 36 m au-dessus du niveau de la mer).

Pour la réalisation des tests *in-vitro*, les feuilles (stade 4 à 5 feuilles) de trois adventices à savoir : *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis* ont été collectées.

Pour la réalisation des tests *in-vivo*, des plantules de *X. strumarium* au stade cotylédonaire ont été collectées et plantées dans un mélange de sol-terreau (2/3: 1/3) réparti dans des pots en plastique (14 cm x 12 cm : diamètre x hauteur), à raison de deux plantules par pot.

Les plantules de *S. oleraceus* ont été obtenues à partir d'un semis dans un mélange sol-terreau (2/3 : 1/3) réparti dans des pots en plastique (9,5 cm x 10,5 cm : diamètre x hauteur). A la levée, cinq plantules ont été gardées par pot.

1.2. Matériel fongique

Les champignons ont été isolés à partir des feuilles des trois adventices (*C. arvensis*, *S. oleraceus* et *X. strumarium*) collectées de la station expérimentale et de la ferme centrale de l'ENSA, ainsi que de la station expérimentale de l'ITGC de Oued Semar à Alger, présentant des symptômes de maladie de taches foliaires.

1.2.1. Isolement

L'isolement a été réalisé selon les étapes suivantes : **1)** découpage des feuilles nécrosées au front d'attaque à l'aide d'un scalpel stérile, **2)** désinfection des fragments coupés avec de l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 2 % durant 5 minutes, **3)** 3 rinçages successifs des fragments dans un bain d'EDS durant 5 minutes pour chaque rinçage, **4)** séchage des fragments sur du papier buvard stérile, **5)** dépôt des fragments dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (5 fragments par boîte) dont la constitution est présentée dans l'**annexe 1.1**, **6)** incubation des boîtes dans l'obscurité à 20 °C.

1.2.2. Repiquage

Après 7 jours de développement des colonies, des explants ont été prélevés de la bordure de la colonie puis déposés au centre de la nouvelle boîte contenant le même milieu de culture. Des préparations microscopiques ont été par la suite effectuées pour observer les structures fongiques.

1.2.3. Monospore des isolats fongiques

Afin de purifier les isolats, des monospores ont été effectuées comme suit : **1)** repiquage des trois isolats dans boîte de Pétri contenant le milieu PDA, **2)** après 21 jours d'incubation, prélèvement des spores à l'aide d'une anse stérile et humide, **3)** dépôt des spores collectées dans 1 ml d'eau stérile suivi d'un passage au vortex, **4)** étalement d'une boucle remplie de cette suspension sur une lame gélosé déjà préparé, **5)** après 48 h, repérage de la spore isolée germée sous-microscope et repiquage dans une nouvelle boîte de Pétri contenant le milieu PDA, **6)** incubation des boîtes à une température de 20 °C, **7)** repiquage à partir de la colonie développée (Leyronas et al., 2012).

1.2.4. Sélection des isolats fongiques

Afin de choisir les isolats les plus agressifs, une sélection a été faite avec un test de pathogénicité sur les feuilles détachées des trois adventices tel que décrit dans le paragraphe dédié à cette partie.

2. Identification des isolats fongiques sélectionnés

2.1. Identification morphologique

Cette identification a porté sur l'examen des symptômes sur les feuilles et de l'aspect morphologique et microscopique des isolats sélectionnés.

L'examen morphologique s'est basé sur l'observation de l'aspect et de la couleur de la colonie ainsi que de la diffusion des pigments hydrosolubles sur le milieu.

Quant à l'examen microscopique, il a consisté en l'observation des structures fongiques telles que le mycélium (septé ou siphonné, hyalin ou pigmenté) et les conidies: leur développement (endogènes ou exogènes, solitaires ou en chaînes), leurs caractéristiques (forme, couleur, nombre et leur disposition de séptations : transversales et longitudinales) et leurs mensurations (mesure de 50 conidies pour chaque espèce à l'aide d'un micromètre) (Chabasse et al., 2002).

2.2. Identification moléculaire

L'ADN des isolats fongiques a été extrait à partir de mycéliums cultivé sur PDA à l'aide de kits QIAGEN DNeasy (50), suivant les instructions du fabricant. Les marqueurs génétiques ITS : ITS1 / ITS4 (Internal Transcribed Spacer), rpb2 (RNA polymérase II second largest subunit) et gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ont été amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) en utilisant les amorces appropriées (**Tableau 3**) (Woudenberg et al., 2013 ; 2015). Toutes les amplifications ont été réalisées à l'aide du thermocycleur MyCycler (Biorad, USA) avec un mélange PCR de 50 µl composé de 2 µl d'ADN génomique, 1 µl de chaque amorce (10 µM), 10 µl de 5x tampon Hot Sart Taq ADN polymérase (Promega, France), 0,2 µl Taq ADN polymérase (5 U/ µl) (Promega, France), 3 µl de MgCl (25 mM) et 0,4 µl de mélange dNTP (25 mM). Les amplifications ont été effectuées pendant 35 cycles, chacun consistant en 30 s à 95 °C, 30 s à 55 °C et 45 s à 72 °C, avec une étape d'activation initiale de 5 min à 95 °C et une extension finale de 5 min à 72 °C.

Les produits PCR (10 µl) ont été séparés sur des gels d'agarose à 1,5 % colorés au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml), puis séparés à 100 V pendant 25 min et visualisés dans le système Gel Doc (Biorad, USA) pour vérifier si la réaction PCR avait réussi.

Les produits PCR ont été nettoyés avec le Wizard® SV PCR Clean-Up System (Promega, France), en suivant le protocole du fabricant. Les produits purifiés ont été séquencés à l'aide d'amorces (ITS, rpb2 et gapdh) et le séquençage Sanger a été effectué à l'aide du kit de séquençage cyclique de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Le séquençage a été effectué par Eurofins Genomics, Allemagne.

Les séquences obtenues (ITS, rpb2 et gapdh) ont été comparées aux séquences de la souche type d'*Alternaria alternata* CBS 916.96 (numéro d'accèsion ; ITS : KF465761, rpb2 : KC584375 et gapdh : AY278808) en utilisant « Align Sequences Nucleotide BLAST, NCBI».

Les séquences des gènes utilisées dans l'identification des isolats ont été déposées en ligne (ITS) ou par le logiciel sequin (rpd2 et gpd2) dans la banque de gènes NCBI.

Tableau 3. Séquences des amorces utilisées.

Amorces	Séquences 5'-3'	Références
ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
gpd1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	Berbee et al., 1999
gpd2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	
fRPB2-5F	GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG	Liu et al., 1999
fRPB2-7cR	CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)CCCAT	

3. Tests de pathogénicité

3.1. Préparation de la suspension de spores

Les suspensions de spores ont été préparées selon les étapes suivantes : **1)** collecte des spores du champignon âgé de 21 jours de la surface de la boîte de Pétri à l'aide d'un racleur stérile après ajout de 5 ml d'EDS, **2)** filtration de la suspension de spores à l'aide d'une passoire permettant d'éliminer le mycélium et ses débris, **3)** évaluation des concentrations initiales des suspensions en utilisant une cellule de Malassez, et ajustement afin d'obtenir la concentration recherchée (Siddiqui et al., 2010). La concentration de 10^6 spores/ml a été utilisée dans toutes les expérimentations (Babu et al.,).

3.2. Test *in-vitro*

Les feuilles détachées des trois adventices ont été déposées (côté dorsal) sur du papier filtre humidifié stérile dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 9$ mm) et traitées par la suspension de spores (50 μ l), les feuilles détachées témoins ont été traités avec de l'eau distillée stérile (EDS), (Chrysai-Tokousbalides, 1997). Toutes les boîtes ont été incubées dans les conditions de laboratoire (à 26 °C et 55 % d'humidité relative, HR). Les observations ont été faites à partir du 2^{ème} jour du traitement et jusqu'au quinzième.

L'estimation de la sévérité de la maladie a été effectuée sur la base d'une échelle de notation de 0 à 5 (Bhat et al., 2013), comme suit : 0 = pas d'infection; 1= 0.1-10 % , 2= 10.1-25 % , 3= 25.1-50 % , 4=50.1-75 % , 5= plus de 75 % de la surface foliaire attaquée.

3.3 Test *in-vivo*

Les plantules des deux adventices *X. strumarium* et *S. oleraceus* (au stade 4-5 feuilles) cultivées en pots ont été inoculées par pulvérisation de la suspension de spores de l'isolat

correspondant. Chez les témoins, les plantules ont été traitées par de l'eau distillée stérile (EDS). Les témoins ont été incubés dans les mêmes conditions que les plantules inoculés.

Sept jours après la première inoculation, une seconde application a été faite afin de mieux favoriser l'expression des symptômes.

Les notations ont été faites à partir du 4^{ème} jour du 1^{er} traitement et jusqu'au 28^{ème} jour.

L'estimation de la sévérité de la maladie a été effectuée avec la même échelle utilisée pour les feuilles détachées.

III. Résultats

Lors des prospections, plusieurs symptômes de maladies ont été observés sur des feuilles attaquées des trois adventices, à savoir des taches nécrotiques, du feutrage blanc sur la face supérieure et des pustules blanches et rouges.

Néanmoins, le symptôme le plus dominant est celui des taches nécrotiques, avec une incidence approximative de 70 % et une sévérité d'attaque allant de 50 à 70 %.

Notre choix s'est porté sur le symptôme des taches nécrotiques en raison de sa prédominance et (incidence et sévérité d'attaque élevées) et la facilité d'isoler les champignons nécrotrophes par rapport aux champignons biotrophes.

Au total, 15 isolats ont été obtenus et soumis à des tests de pathogénicité sur les feuilles détachées des trois adventices. Les trois isolats les plus agressifs ont été retenus (l'isolat 1 codé "X3", l'isolat 2 codé "S1" et l'isolat 3 codé "C1" isolés respectivement des feuilles de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*).

L'identification morphologique et moléculaire de ces trois isolats a montré qu'ils appartiennent tous à *Alternaria alternata*.

1. Symptomatologie et aspect cultural et morphologique des conidies

1.1. *Alternaria alternata* isolat X3

Ce champignon infecte les feuilles de *Xanthium strumarium*, sur lesquelles il produit de nombreuses tâches nécrotiques, brunes circulaires ou irrégulières, entourées d'un halo chlorotique (**Figure 4-a1**). Cultivé sur le milieu PDA, le champignon pousse d'une manière suffisamment rapide. Les colonies sont de couleur vert foncé au centre et vert clair à la périphérie (**Figure 4-a2**). Le mycélium est mélanisé et ras. Les conidies mesurant 15-30 x 5-10 μm sont ellipsoïdes teintées de brun et forment de longues chaînettes acropètes (6-12

conidies) (**Figure 4-a3**). Elles sont pourvues de séptations transversales (2-4) et longitudinales (0-3), ainsi que d'un bec court mesurant 2,5-10 μm (**Figure 4-a4**). Ces caractéristiques morphologiques sont semblables à celles d'*Alternaria tenuissima* (Champion, 1997 ; Simmons, 2007).

1.2. *Alternaria alternata* isolat S1

Ce champignon infecte les feuilles et les tiges de *Sonchus oleraceus* sur lesquelles il forme des tâches nécrotiques apparaissant sous forme d'anneaux concentriques entourés d'un cercle noir (**Figure 4-b1**). La colonie de ce champignon forme sur le milieu PDA des cercles concentriques de couleur brun foncé (**Figure 4-b2**) et possède un mycélium mélanisé et cloisonné. Les conidies de forme ellipsoïdale (20-35 \times 7-13 μm), sont de couleur brun olive pourvues de séptations transversales (2-4) et longitudinales (0-2), ainsi que d'un bec court mesurant 2,5-5 μm (**Figure 4-b4**) et forment de courtes chaînes acropètes (≤ 4) (**Figure 4-b3**). Sur la base de ces caractéristiques, le champignon a été identifié comme étant *Alternaria alternata* (Simmons, 2007).

1.3. *Alternaria alternata* isolat C1

Les symptômes sur les feuilles de *Convolvulus arvensis* apparaissent sous forme d'anneaux concentriques bruns (**Figure 4-c1**). Les colonies fongiques se présentent sous la forme de cercles concentriques de couleur gris-vert entourés d'un cercle vert clair (**Figure 4-c2**). Le champignon possède un mycélium mélanisé aérien plus ou moins dense. Les conidies (15-30 \times 7,5-12,5 μm) forment de courtes chaînes acropètes (≤ 4) (**Figure 4-c3**), elles sont de forme ellipsoïdale ou obclavée, de couleur brun olive foncé et divisées par 2-3 septa transversaux et 1-2 septa longitudinaux, elles sont aussi pourvues d'un bec court mesurant 2,5-10 μm (**Figure 4-c4**). Selon ces caractéristiques, ce champignon a été aussi identifié comme étant *Alternaria alternata* (Simmons, 2007).

Le **tableau 4** présente une comparaison des symptômes de maladie et des caractéristiques morphologiques des trois isolats d'*Alternaria alternata* (X3, S1 et C1).

Tableau 4. Tableau comparatif des symptômes et des caractéristiques morphologiques des trois isolats d'*Alternaria alternata*.

Isolats / Caractéristiques	<i>A. alternata</i> X3	<i>A. alternata</i> S1	<i>A. alternata</i> C1
Symptômes	Tâches nécrotiques brunes circulaires ou irrégulières, entourées d'un halo chlorotique.	Tâches nécrotiques sous forme d'anneaux concentriques entourés d'un cercle noir.	Tâches nécrotiques sous forme d'anneaux concentriques bruns.
Aspects culturaux	Couleur vert foncé au centre et vert clair à la périphérie.	Cercles concentriques de couleur brun foncé.	Cercles concentriques de couleur gris-vert entourés d'un cercle vert clair.
Formes et couleurs des conidies	Ellipsoïdes brunes	Ellipsoïdes de couleur brun olive	Ellipsoïdes ou (obclavée), de couleur brun olive foncé
Mesure des conidies	15-30 x 5-10 µm	20-35×7-13 µm	15-30×7,5-12,5 µm
Mesure des becs	2,5-10 µm	2,5-5 um	2,5-10 µm
Type et nombre de séptations	2-4 trans. 0-3 long.	2-4 trans. 0-2 long.	2-3 trans. 1-2 long.
Type de Chainette	Longue	Courte	Courte

Trans.: Transversale, Long.: Longitudinales.

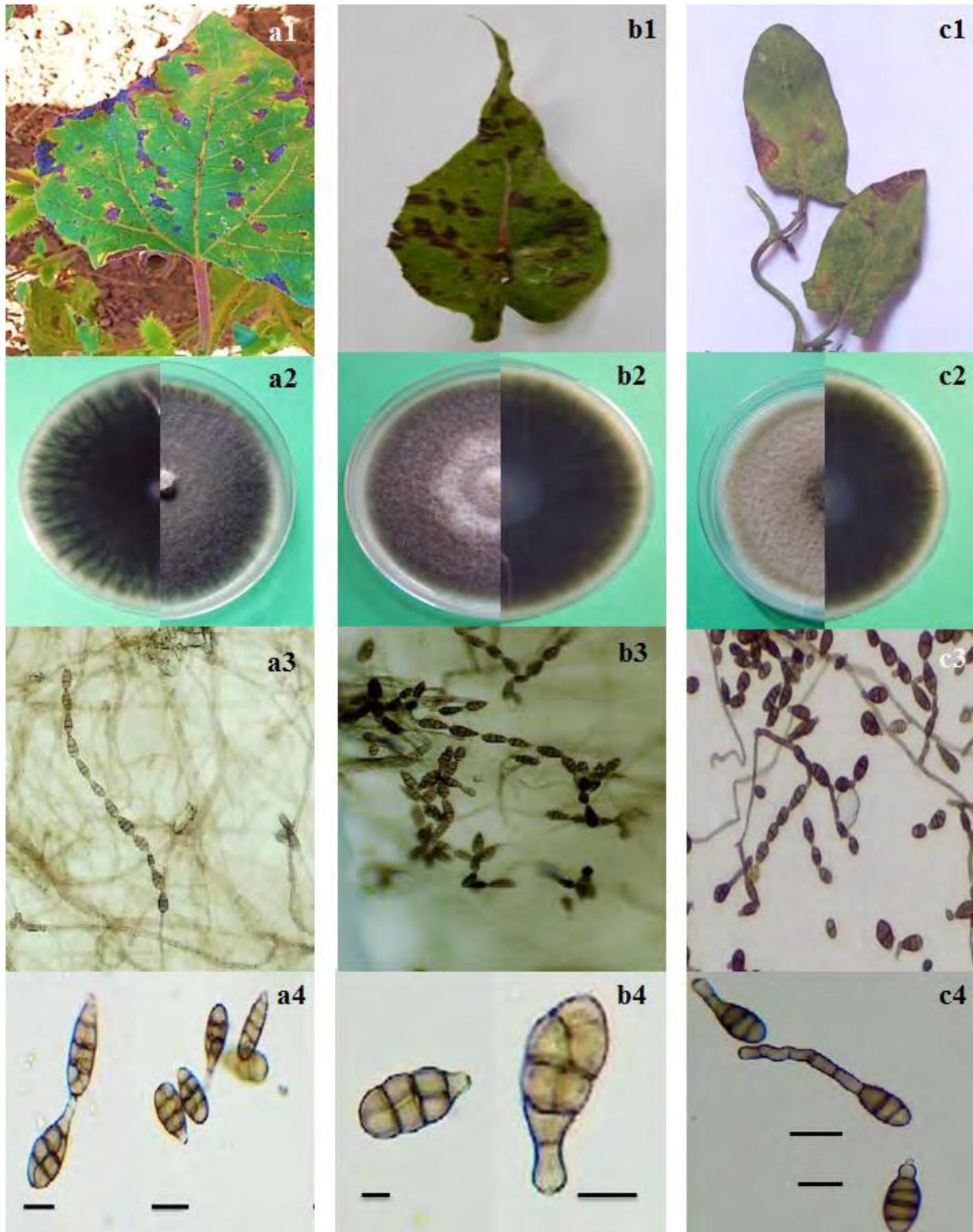


Figure 4. Taches foliaires de *Xanthium strumarium* (a), *Sonchus oleraceus* (b) et *Convolvulus arvensis* (c) causées par l'isolat X3, S1 et C1 d'*Alternaria alternata*. a1, b1, c1 / Symptômes sur feuilles prélevées au champ, a2, b2, c2 / Croissance des colonies sur milieu PDA (faces supérieure et inférieure), a3, b3, c3 / Chainettes de conidies (Gr. $\times 100$), a4, b4, c4 / Conidies (Gr. $\times 400$). Échelle = 5 μm .

2. Identification moléculaire

L'alignement des séquences obtenues des trois marqueurs génétiques ITS1/ITS4, rpd2 et gapdh des trois isolats fongiques avec les séquences d'ITS1/ITS4, rpd2 et gapdh de la souche type CBS 916.96 d'*Alternaria alternata* a montré une grande similarité, les taux de similitude sont mentionnés dans le **Tableau 5**.

Après avoir déposé les séquences dans la banque de gènes NCBI, cette dernière a attribué à son tour des numéros d'accèsion pour chaque séquence des trois marqueurs génétiques ITS1/ITS4, rpb2 et gapdh des trois isolats fongiques (**Tableau 6**).

Tableau 5. Taux de similitude de chaque séquence des trois marqueurs génétiques des trois isolats fongiques avec les séquences des trois marqueurs génétiques de la souche type CBS 916.96.

Marqueurs génétiques Isolats	ITS/ITS	rpb2	Gapdh
<i>Alternaria alternata</i> X3	99%	99%	99%
<i>Alternaria alternata</i> S1	99%	/	/
<i>Alternaria alternata</i> C1	99%	99%	/

Tableau 6. Numéros d'accèsion de chaque séquence des trois marqueurs génétiques ITS, rpb2 et gapdh des trois isolats fongiques.

Marqueurs génétiques Isolats	ITS1/ITS4	Rpb2	Gapdh
<i>Alternaria alternata</i> X3	MH827056	MN922279	MN971577
<i>Alternaria alternata</i> S1	MH879766	/	/
<i>Alternaria alternata</i> C1	MH828350	MN922280	/

3. Pathogénicité

Deux jours après l'inoculation, toutes les feuilles détachées inoculées de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis* ont montré des symptômes. À la fin de l'essai, les feuilles ont atteint une sévérité de maladie (nécrose) supérieur à 90 %. Pour ce qui est de l'essai sur les plantules, une semaine après inoculation des plantules, des symptômes de taches foliaires sont apparus sur les feuilles des plantules de *X. strumarium* et *S. oleraceus*, qui étaient similaires à ceux des feuilles infectées naturellement.

À la fin du test, une sévérité de maladie de 69 % a été notée. Les trois champignons ont été systématiquement ré-isolés de feuilles inoculées de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*.

IV. Discussion

Les résultats obtenus ont montré que les trois champignons isolés des trois adventices (*X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*) appartiennent tous à l'espèce d'*Alternaria alternata*. Ces champignons ont causé les mêmes symptômes mais ils ont montré différents aspects cultureux et morphologiques, ceci est en accord avec Pusz (2009) a rapporté que les isolats d'*Alternaria alternata* isolés d'*Amaranthus cruentus*, *A. paniculatus* et *A. retroflexus* ont différentes durées de croissance et différents aspects cultureux. Bessadat et al. (2014) ont trouvé aussi que l'aspect culturel (forme, couleur et aspect de mycélium) des isolats d'*Alternaria alternata* obtenus de tomate était différent. Différents aspects cultureux et morphologiques ont été également exhibés par les isolats d'*Alternaria mali* et *Alternaria porri* (Sofi et al., 2013 ; Mohsin et al., 2016).

Cette différence morphologique peut être expliquée par la différence d'hôtes, les caractères phénotypiques sont influencés par les conditions environnementales et peuvent être responsables d'une telle variabilité (Sofi et al., 2013).

Afin de vérifier l'existence de travaux signalant l'existence d'*A. alternata* sur ces trois adventices, plusieurs bases de données en ligne ont été consultées (CAB: Centre for Agriculture and Bioscience International, CBS: Centraal bureau voor Schimmel cultures, ARS Culture Collection (NRRL): Agricultural Research Service Culture Collection (Northern Regional Research Laboratory)).

Un peu plus de 60 espèces fongiques ont été signalées sur *X. strumarium*, sur *S. oleraceus* et sur *C. arvensis* (Farr & Rossman, 2018). Les genres les plus communs sont *Oidium* sur *X. strumarium*, *Bremia*, *Puccinia* et *Septoria* sur *S. oleraceus*, *Erysiphe* et *Septoria* sur *C. arvensis*.

Seules quelques espèces d'*Alternaria* ont été signalées sur ces trois adventices. *Alternaria tenuis*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae* et *Alternaria tenuissima* ont déjà été signalés sur *X. strumarium* (Quimby, 1989 ; Abbas & Barrentin, 1995 ; Vurro et al., 1998 ; Farr & Rossman, 2018), seul *Alternaria sonchi* est connu pour infecter naturellement *S. oleraceus* (Simmonds, 1966). *Convolvulus arvensis* a été signalé comme hôte d'*Alternaria*

brassicae, *A. solani*, *A. tenuissima* var. *godetiae* et *A. triticina* (Saleem et al., 2015 ; Farr & Rossman, 2018). *Alternaria alternata* a également été isolé à partir de *C. arvensis* et évalué pour son potentiel herbicide (Pfirter et al., 1997 ; Zeidali, 2011). Il s'agit d'un premier signalement d'*A. alternata* infectant naturellement *X. Strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis* en Algérie.

I. Introduction

La gestion des maladies en agriculture est principalement réalisée par l'application des pesticides chimiques. Cette stratégie de protection est efficace et rentable mais elle présente des risques pour l'homme et l'environnement (Leach & Mumford, 2008), d'où la nécessité de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse en faveur de produits alternatifs non chimiques (Manganiello et al., 2018) ou de réduire les doses recommandées (Barros et al., 2011 ; Talgre et al., 2004).

Par conséquent, l'élaboration de stratégies biologiques visant à améliorer la production végétale et la salubrité des aliments est devenue un sujet de recherche de pointe en sciences biologiques et agricoles (Manganiello et al., 2018). De nombreux micro-organismes bénéfiques sont déjà utilisés comme ingrédients actifs dans les bio-pesticides, les bio-fertilisants et les bio-stimulants (Verma et al., 2007). L'une des stratégies les plus efficaces pour lutter contre les adventices est la lutte biologique avec des champignons phytopathogènes (Boyette et al., 1996).

Plusieurs espèces d'*Alternaria* ont été évaluées pour leur potentiel mycoherbicide contre les adventices. À titre d'exemple on peut citer, *A. macrospora* et *A. alternata* utilisées pour contrôler *Parthenium hysterophorus* (Saxena & Kumar, 2007 ; 2010 ; Kaur & Aggarwal, 2015), *A. sonchi* contre *Sonchus arvensis* (Berestetskiy et al., 2015), *A. zinniae* contre *Xanthium occidentale* (Vurro et al., 1998), *A. helianthi* contre *Xanthium strumarium* (Abbas & Barrentine, 1995) et *A. alternata* contre *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Rumex dentatus*, *Eupatorium adenophorum*, *Viscum album*, *Ageratina adenophora* et *Eichhornia crassipes* (Ghorbani et al., 2000 ; Lawrie et al., 2002 ; Babu et al., 2003 ; El-Morsy et al., 2006 ; Qiang et al., 2006 ; Ray et al., 2008 ; Qiang et al., 2010 ; Siddiqui et al., 2010 ; kotan et al., 2012).

Ces champignons peuvent produire des nécroses et des taches entourées de halos. Ces symptômes sont couramment observés dans le processus d'infection des agents pathogènes nécrotrophes (Thomma, 2003), et sont dus soit à l'entrée des champignons, soit à la diffusion de métabolites fongiques dans le tissu végétal, ou les deux (Agarwal et al., 1997 ; Thomma, 2003).

Les mycoherbicides sont cependant toujours influencés par les conditions environnementales, en particulier la température et l'humidité et nécessitent donc, une formulation adéquate (Auld et al., 2003). Les formulations liquides de champignons sont généralement les meilleures dans la lutte contre les adventices, ils sont utilisées

principalement pour initier la maladie sur les feuilles et les tiges (Boyette et al., 1996). Une étude menée par Shabana (2005) a montré que la formulation de spores d'*Alternaria eichhorniae* à base d'huile végétale (huile de coton et de tournesol) a augmenté significativement la sévérité de la maladie sur la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*) par rapport au témoin non traité. De même, la formulation de spores dans une émulsion d'huile végétale (huile de maïs et de colza) a significativement amélioré l'efficacité d'*A. alternata* dans la lutte contre cette dernière (Babu et al., 2003 ; El-Morsy et al., 2006).

Le but de cette partie du travail est: i) d'évaluer le potentiel mycoherbicide des trois isolats d'*Alternaria alternata* et de leurs formulations liquide et solide à l'égard de leurs adventices cibles, à savoir *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis* dans des conditions contrôlées et au champ.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Des plantules, des feuilles détachées, des graines et des capsules collectées de la station expérimentale de l'ENSA, ainsi que des plantules issues de semis de graines représentent le matériel végétal utilisé dans ce chapitre.

Pour la réalisation des tests *in-vitro*, les feuilles saines de *X. strumarium*, *S. oleraceus*, *C. arvensis* et *Convolvulus althaeoides*, les graines de *S. oleraceus* et de *Cuscuta campestris* Yunker et les capsules de *X. strumarium* ont été utilisées.

Pour la réalisation des essais *in-vivo*, les plantules de *X. strumarium* et de *S. oleraceus* utilisées dans ce chapitre ont été obtenues comme précédemment décrit dans le chapitre 2.

Afin d'évaluer la spécificité des isolats X3, C1 et S1 d'*A. alternata*, un test de pathogénicité a été réalisé sur une gamme d'hôtes comportant quatre cultures (tomate, blé, fève et courgette) représentant les familles les plus cultivées en Algérie. Les plantules de la tomate (*Solanum lycopersicum* var. Saint Pierre, Romavif, Heinz et Marmande, Solanaceae) et de la courgette (*Cucurbita pepo* var. Quarantaine, Cucurbitaceae) ont été obtenues à partir de semis de graines dans des plaques alvéolées placées sous abri-serre. Après un mois de croissance, les plantules (1 plantule de tomate et deux plantules de courgette, respectivement par pot) ont été transplantées dans des pots en plastique (14 cm x 12 cm : diamètre x hauteur) contenant un mélange sol-terreau (2/3 : 1/3).

Les plantules de la fève (*Vicia faba* var. Aquadulce, Fabaceae) et du blé (*Triticum aestivum* var. Vitron, Poaceae) ont été obtenues à partir de semis de graines directement dans un mélange sol-terreau (2/3 : 1/3) dans des pots en plastique (14 cm x 12 cm et 9,5 cm x 10,5

cm : diamètre x hauteur, respectivement), seules trois plantules de fève et de blé ont été gardé par pot. Les pots ont été placés sous serre à des températures allant de 20 à 32 °C et une humidité relative (HR) variant de 32 à 61%.

Pour la conduite des tests *in-vitro*, le matériel végétal (graines, feuilles détachées) a été désinfecté par trempage dans l'hypochlorite de sodium à 2° pendant 5 minutes, puis rinçage 3 fois avec de l'eau distillée stérile (EDS) pendant 5 min, et enfin par séchage sur du papier buvard stérile.

2. Matériel fongique

2.1. Préparation de la suspension de spores

Les suspensions de spores des trois isolats X3, S1 et C1 ont été préparées comme décrit dans le chapitre 2.

2.2. Préparation des formulations

2.2.1. Formulation liquide

La préparation de la formulation liquide a nécessité les étapes suivantes : **1)** mélange de 0,1 ml de Tween 80 avec 10 ml d'huile de colza pure légèrement chauffée, **2)** agitation du mélange huile-Tween 80 puis l'ajout de 90 ml de la suspension de spores, **3)** émulsion de la solution avec un agitateur magnétique pendant 3 minutes à une vitesse réduite (Babu et *al.*, 2003).

2.2.2. Formulation solide

La formulation solide a été préparée comme suit : **1)** versement de 3 g de poudre d'alginate de sodium dans 100 ml de la suspension de spores, **2)** agitation du mélange alginate-suspension de spores pendant 30 min, **3)** préparation d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 0,25 M (7,4 g / 500 ml), **4)** prélèvement du mélange à l'aide d'une seringue stérile et injection dans la solution de chlorure de calcium pour l'obtention des granules (**Figure 5**), **5)** rinçage des granules formées avec de l'eau distillée dans une passoire et séchage sur papier buvard, **6)** stockage des granules à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les granules d'alginates sans champignon ont été utilisées comme témoin (Abdel-Fattah, 2002 modifié).

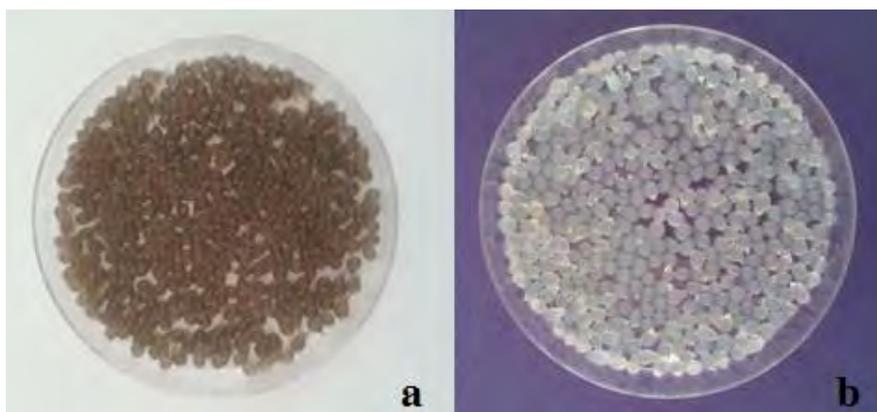


Figure 5. Granules d'alginate ; a/ avec les spores d'*Alternaria alternata*, b/ sans les spores d'*Alternaria alternata*.

3. Herbicide «Mustang»

Le choix de l'herbicide a été fait selon l'efficacité de la matière active (2,4-D) à l'égard des trois adventices testées (*C. arvensis*, *S. oleraceus* et *X. strumarium*) et la disponibilité du produit (Hutchinson et al., 1984 ; Mamarot & Bouchet, 1988).

Le nom commercial de l'herbicide utilisé est «Mustang® 360 SE», efficace contre les adventices dicotylédones. Le produit est homologué en Algérie par la Direction de la Protection des Végétaux et des Contrôles Techniques (N° d'homologation : 14 54 031).

La matière active est FLORASULAM+2,4 D (avec une concentration de 6,25 g/L + 300 g/L).

La formule chimique est: 1) Florasulam : N-(2,6-Difluorophényl)-8-fluoro-5méthoxy [1,2,4] triazolo [1,5-c] pyrimidine-2-sulfonamide , 2) 2,4-D : Acide2,4dichlorophénoxy-acétique).

La formulation est sous forme de solution liquide et la dose préconisée au champ est de 0,6 L/ha. Dans la présente étude la dose utilisée est de 0,45 L/ha (soit 75 % de la dose préconisée). Cette dose s'est révélée très efficace pour le contrôle des adventices (Auskalnis & Kadzys, 2006).

3.1. Estimation de la quantité d'herbicide utilisée et le choix de la dose

L'estimation de la quantité d'herbicide utilisé dans les tests est en relation avec la surface foliaire de l'adventice et le nombre de feuilles utilisées dans chaque essai.

Une moyenne de la surface d'une dizaine de feuilles de chaque adventice a été calculée, la surface des feuilles a été estimée à l'aide d'un scanner et le logiciel «image J ».

Pour quantifier la dose d'herbicide nécessaire pour traiter une seule feuille, la règle de trois a été utilisée en se basant sur la dose réduite choisie. Pour le traitement de l'ensemble des feuilles utilisées dans l'essai, la quantité nécessaire pour une seule feuille a été multipliée par le nombre de feuilles de l'adventice utilisées.

La quantité du produit nécessaire pour chaque essai a été diluée dans une quantité d'eau (quantité d'eau = quantité nécessaire pour pulvériser les plantules de l'essai - quantité du produit nécessaire pour l'essai).

4. Évaluation de l'effet d'*Alternaria alternata* isolats X3, S1 et C1 à l'égard de leurs adventices cibles.

4.1. Essais *in-vitro*

4.1.1. Évaluation de l'effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1 sur le taux de germination de graines de *Xanthium strumarium* et *Sonchus oleraceus*, respectivement.

L'évaluation de l'effet d'*A. alternata* a porté seulement sur les graines de *Xanthium strumarium* et de *Sonchus oleraceus* du fait de la difficulté de trouver les graines de *C. arvensis*.

4.1.1.1. Graines de *X. strumarium* et de *S. oleraceus*

Les fruits de *X. strumarium* se présentent sous forme de capsules dures, ligneuses, et hérissées de nombreuses épines. Pour extraire les graines, les épines ont été coupées à l'aide de ciseaux et le péricarpe ligneux, à l'aide de scalpel. Les fruits de *S. oleraceus* se présentent sous forme d'akènes secs, indéhiscent à graine unique surmonté d'une aigrette. Les akènes sans aigrettes ont été utilisés dans le semis.

4.1.1.2. Enrobage des graines de *X. strumarium* et *S. oleraceus* et test de germination

Les graines désinfectées de *X. strumarium* et *S. oleraceus* ont été trempées dans la suspension de spores (1×10^6 conidies / ml) de l'isolat correspondant et dans l'EDS pendant 24h.

Dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 5$ mm), les graines enrobées de *X. strumarium* (4 graines par boîte) et de *S. oleraceus* (50 graines par boîte) ont été éparpillées sur du papier filtre humidifié. Le taux de germination des graines a été calculé après 9 jours d'incubation à 30 °C pour *X. strumarium*, et après 6 jours d'incubation à une température de 25 °C pour *S. oleraceus*.

4.1.2. Évaluation de l'effet d'*Alternaria alternata* isolats X3, S1 et C1 sur les feuilles détachées de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*, respectivement *in-vitro*.

Les feuilles détachées des trois adventices ont été déposées (côté dorsal) sur du papier filtre humidifié stérile dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 9$ mm) et traitées par : la suspension de spores (50 μ l, 10^6 conidies / ml), la formulation liquide (50 μ l, 10^6 conidies / ml) et la formulation solide (0,1 g de granules déposées sur la surface ventrale de chaque feuille). Les témoins ont été traités avec de l'eau distillée stérile (EDS), l'huile de colza ou les granules d'alginate sans champignons (Chrysai-Tokousbalides, 1997). Toutes les boîtes ont été incubées dans les conditions de laboratoire (à 26 °C et 55% d'humidité relative, HR). Les notations ont été faites à partir du 2^{ème} jour du traitement et jusqu'au quinzième jour. L'estimation de la sévérité des différents traitements testés a été effectuée avec la même échelle de notation utilisée pour les feuilles détachées dans le chapitre 2.

4.1.3. Évaluation de l'effet d'*A. alternata* isolat C1 sur deux autres espèces de la famille des Convolvulacées (*Convolvulus althaeoides* L. et *Cuscuta campestris* Yunker).

Alternaria alternata isolat C1 a été testé également sur deux autres espèces de la famille des Convolvulacées, à savoir *C. althaeoides* et *Cuscuta campestris* afin d'évaluer le spectre d'action de cet isolat.

4.1.3.1. Essai sur les feuilles détachées de *Convolvulus althaeoides*

Les feuilles détachées de *C. althaeoides* ont été étendues (côté dorsal) sur du papier filtre humidifié stérile dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 9$ mm) et traitées par 50 μ l de la suspension de spores (1×10^6 conidies / ml) d'*A. alternata* isolat C1, Les feuilles traitées par la même quantité d'EDS servent de témoin. Les boîtes ont été incubées à 25 °C et 47 % d'humidité relative dans les conditions du laboratoire (25 °C et 47% d'HR). Les notations ont été faites à partir du 2^{ème} jour de l'inoculation et jusqu'au 15^{ème} jour en utilisant l'échelle de Bhat et al., 2013).

4.1.3. 2. Essai sur la germination des graines de *Cuscuta campestris*

a. Levée de la dormance tégumentaire

Afin de lever la dormance tégumentaire des graines de *C. campestris*, les étapes suivantes ont été suivies: **1)** trempage des graines de la cuscute dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré pur avec agitation pendant 15 min à l'aide d'un agitateur magnétique, **2)** filtration à travers une grille métallique, **3)** rinçage des graines traitées abondamment à l'EDS pour éliminer les débris des téguments, **4)** séchage des graines sur du papier filtre stérile, **5)**

conservation des graines dans des tubes Eppendorf® stériles dans les conditions de laboratoire.

b. Test sur la germination des graines de *Cuscuta campestris*

Les graines de la cuscute ont été trempées dans la suspension de spores (1×10^6 conidies / ml) de l'isolat C1 et dans l'EDS pendant 24h.

Les graines enrobées de la cuscute ont été éparpillées sur du papier filtre stérile humidifié dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 5$ mm). Après 6 jours d'incubation à 20 °C, le taux de germination des graines a été déterminé.

4.2. Essais *in-vivo*

L'essai *in-vivo* a été réalisé seulement sur les plantules de *X. strumarium* et de *S. oleraceus* du fait de la difficulté de faire pousser les plantules de *C. arvensis* en pot.

4.2.1. Évaluation de l'effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1 et de leurs formulations sur les plantules de *X. strumarium* et *S. oleraceus* en pots.

Les plantules des deux adventices *X. strumarium* et *S. oleraceus* (au stade 4-5 feuilles) cultivées en pots (14 cm x 12 cm et 9,5 cm x 10,5 cm : diamètre x hauteur, respectivement) ont été inoculées par pulvérisation de la suspension de spores (1×10^6 conidies / ml), de la formulation liquide ou de l'herbicide à dose réduite. Les plantules ont été également traitées par la formulation solide, à raison de 0.1 g de granules déposées sur chaque feuille. Chez les témoins, les plantules ont été traitées par de l'eau distillée stérile (EDS), par l'huile de colza ou des granules d'alginates sans champignons. Les témoins ont été placés dans les mêmes conditions que les traitements inoculés.

Sept jours après la première inoculation, une seconde application a été faite afin de mieux favoriser l'expression des symptômes (Siddiqui et al., 2010).

Les notations ont été faites à partir du 4^{ème} jour du 1^{er} traitement et jusqu'au 45^{ème} jour.

L'estimation de la sévérité des différents traitements testés *in vivo* a été effectuée avec la même échelle utilisée pour les feuilles détachées dans le chapitre 2.

Les paramètres mesurés à la fin de l'essai sont : la longueur des tiges, la longueur des racines et le poids sec.

4.3. Essai *in-situ*

4.3.1. Évaluation de l'effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et C1 et de leurs formulations sur les plantules de *X. strumarium* et *S. oleraceus* au champ

4.3.1.1. Dispositif expérimental

L'essai a été mené à la station expérimentale de l'ENSA durant le printemps (mars à juin) de 2017 et répété en 2018. Les conditions de températures et des précipitations prévalant durant les périodes de l'essai sont données dans le **tableau 7**. L'essai a été conduit sur deux parcelles au sol limoneux (**Tableau 8**) de 34.79 m² (7.1 x 4.9 m) (une parcelle pour chaque adventice). chacune des parcelles a été divisée en 35 micro-parcelles de 0,25 m² (0,5 x 0,5 m), les micro-parcelles ont été disposées en cinq blocs entièrement randomisés (cinq répétitions), chaque bloc contenant sept micro-parcelles dans lesquelles les 7 traitements suivants ont été distribués de façon aléatoire : 3 traitements avec chacun des champignons testés: suspensions des spores (S.S.), formulation liquide (F.L.), formulation solide (F.S.), avec leur trois témoins respectifs : EDS (Tém. S.S.), la formulation liquide sans champignon (Tém. F.L.), formulation solide sans champignon (Tém. F.S.), ainsi que l'herbicide Mustang® à dose réduite. Des micro-parcelles nues (0,6m x 0,5m) ont été utilisées entre chaque deux blocs ou chaque 2 micro-parcelles plantées pour éviter toute interaction possible entre les différents traitements (**Figure 6**).

Dans la parcelle de *X. strumarium*, 09 plants au stade cotylédonaire ont été plantés par micro-parcelle (trois plants par ligne). Dans la parcelle de *S. oleraceus*, 30 g de graines ont été semées en trois lignes par micro-parcelle.

Tableau 7. Températures et précipitations pendant les périodes des essais au champ.

Période du test	2017		2018	
	Températures moyennes (°C)	Précipitations totales (mm)	Températures moyennes (°C)	Précipitations totales (mm)
Mars	14,3	55,0	14,1	38,8
Avril	15,9	21,3	16,3	42,4
Mai	19,9	08,4	18,5	24,0
Juin	24,4	08,8	23,1	08,5
	18,6	93,5	18,0	113,7

* Source: Office National de Météorologie (ONM-Alger)

Tableau 8. Les paramètres physico-chimiques du sol des parcelles expérimentales.

Paramètres du sol	Parcelle de <i>Xanthium strumarium</i>	Parcelle de <i>Sonchus oleraceus</i>
Paramètres physiques	Valeurs	
Argile (%)	09,17	16,15
Limon (%)	69,50	64,55
Sable (%)	21,33	19,30
	} *Texture limoneuse	} *Texture limoneuse
pH	07,15	07,20
CE (dS/m)	0,68	0,81
Paramètres chimiques		
CaCO ₃ (%)	0,00	4,15
MO (%)	1,63	1,14
Azote (%)	0,008	0,016
Phosphore (PPm)	57,4	140,3
Potassium (mg/100 g)	0,54	0,50

* Déterminé par le triangle de texture du sol basé sur les pourcentages d'argile, de limon et de sable.
 MO: Matière Organique. CE: Conductivité Électrique exprimée en déci-Siemens par mètre (dS/m).

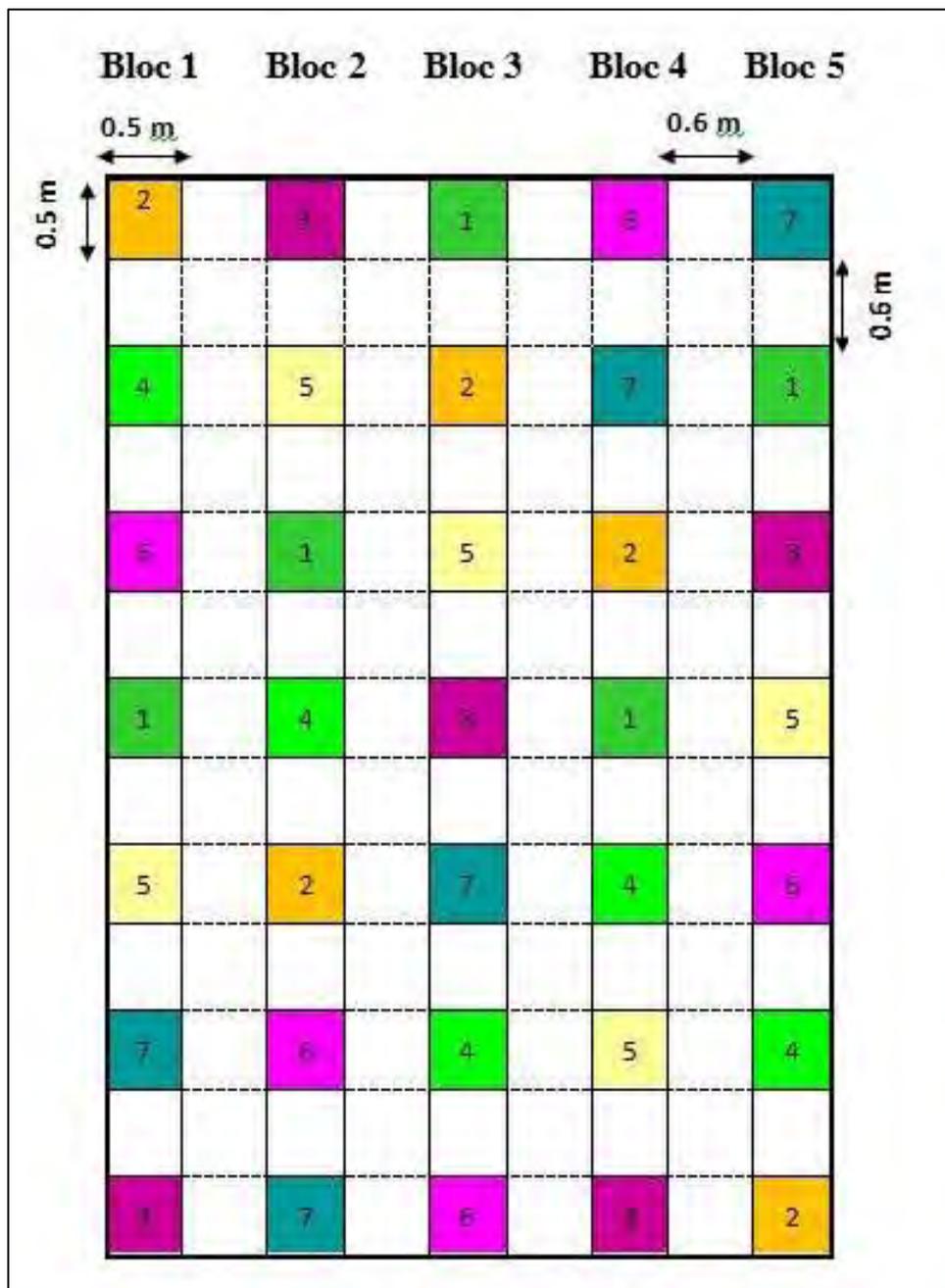


Figure 6. Dispositif expérimental. 1: Suspension de spores (S.S.), 2: Formulation liquide (F.L.), 3: Formulation solide (F.S.), 4: Témoin EDS, 5: Témoin F.L., 6: Témoin F.S., 7: Mustang Herbicide.

4.3.1.2. Application des traitements

Les plantules des deux adventices ont été traitées au stade 4-5 feuilles par la suspension de spores de l'isolat correspondant (1×10^6 conidies / ml), ou la formulation liquide (1×10^6 conidies / ml), ou par l'herbicide à dose réduite (10 ml par micro-parcelle et par traitement). Pour les plantules traitées par la formulation solide, 0,1 g de granules ont été posés sur chaque

feuille. Chez les témoins les mêmes quantités d'EDS, de l'huile de colza, ou des granules d'alginate sans champignons ont été utilisées. Sept jours après les premiers traitements, une seconde application a été faite afin de mieux favoriser l'expression des symptômes.

Les notations ont été faites à partir du 6ème jour du traitement et jusqu'au 45ème jour. L'estimation de la sévérité des différents traitements testés *in situ* a été effectuée sur la base d'une échelle de notation de 1 à 9 (EPPO, 2008 -**Tableau 9**).

Les paramètres de croissance pris en considération la fin de l'essai sont : la longueur des tiges, la longueur des racines et le poids sec des plantes.

Tableau 9. Echelle de notation de la sévérité des attaques par *Alternaria alternata* et *Alternaria solani* proposée par (EPPO, 2008).

Description des feuilles attaquées par <i>Alternaria alternata</i> et <i>Alternaria solani</i> .	Sévérité (%)
Pas d'infestation visible	00
100 lésions par plant	02.50
10 % du feuillage nécrosé par bloc	10.00
25 % du feuillage nécrosé par bloc	25.00
50 % du feuillage nécrosé par bloc	50.00
75 % du feuillage nécrosé par bloc	75.00
90 % du feuillage nécrosé par bloc	90.00
97,5 % du feuillage nécrosé par bloc	97.50
Destruction totale des plants	100

5. Gamme d'hôtes

Les feuilles détachées et désinfectées des quatre plantes cultivées ainsi que leurs plantules cultivées en pots ont été inoculées par pulvérisation de la suspension de spores (1×10^6 conidies / ml) des trois isolats d'*A. alternata*. Les feuilles détachées des trois adventices (*X. strumarium* et *S. oleraceus* et *C. arvensis*) et les plantules des deux adventices (*X. strumarium* et *S. oleraceus*) cultivées en pots ont été également traitées en même temps et dans les mêmes conditions.

Chacune des adventices a été inoculée par son propre isolat fongique. Après une semaine, une 2^{ème} inoculation a été faite. Les témoins ont été traités avec l'EDS.

L'observation des éventuels symptômes a été faite durant toute la période d'essai (un mois).

6. Traitements statistiques

Toutes les expérimentations ont été menées selon un dispositif en blocs aléatoires complets. 5 répétitions ont été réalisées pour chaque traitement, et chaque expérimentation (essai) a été répétée deux fois dans le temps. Les données des essais menés au laboratoire et sous serre ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA uni-factorielle) et les résultats d'une seule répétition dans le temps sont présentés en raison de la tendance similaire des réponses champignons-plantes. Les données des expérimentations au champ ont été analysées pour chaque période d'essai, soit 2017 et 2018 (ANOVA bi-factorielles). Les moyennes ont été comparées en utilisant le HSD de Tukey à $P \leq 0,05$ en utilisant le logiciel STATISTICA (Statistica version 8,5, année 2014).

III. Résultats

1. Essais *in-vitro*

1.1. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1 sur la germination des graines de *X. strumarium* et de *S. oleraceus*, respectivement

Les analyses statistiques du taux de germination des graines de *S. oleraceus* enrobées par la suspension de spores d'*A. alternata* S1 ont montré une réduction significative par rapport aux graines traitées à l'EDS (80,48 % d'inhibition de la germination). Par contre, les graines de *X. strumarium* enrobées par la suspension de spores d'*A. alternata* X3 ont présenté un taux de germination similaire à celui des graines traitées à l'EDS (**Tableau 10**).

Tableau 10. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1 sur le taux de germination de graines de *Sonchus oleraceus* et *Xanthium strumarium*, respectivement.

Traitements	Taux de germination (%)	
	<i>Xanthium strumarium</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>
Suspension de spores (S.S.)	62,5 a	14,4 b
Témoin (EDS)	62,5 a	73,8 a

Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test du Tukey au seuil de 5 %. E.D.S. : Eau Distillée Stérile.

1.2. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3, S1 et C1 et de leurs formulations sur les feuilles détachées de *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis*, respectivement

Les analyses de la variance à un seul facteur ont montré un effet très hautement significatif ($P < 0,001$) de la suspension de spores d'*A. alternata* isolats X3, S1 et C1 et de leurs formulations liquide et solide sur la sévérité de maladie sur les feuilles détachées de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*, respectivement. La formulation liquide a causé la sévérité de maladie la plus élevée sur les feuilles détachées des trois adventices (98,4-99,5 %), suivies de la suspension de spores (90-95 %), puis de la formulation solide (35 à 55 %) (Figure 7). Les feuilles détachées chez les témoins sont restées saines. Les symptômes sont toujours apparus en premier chez les feuilles traitées par la formulation liquide.

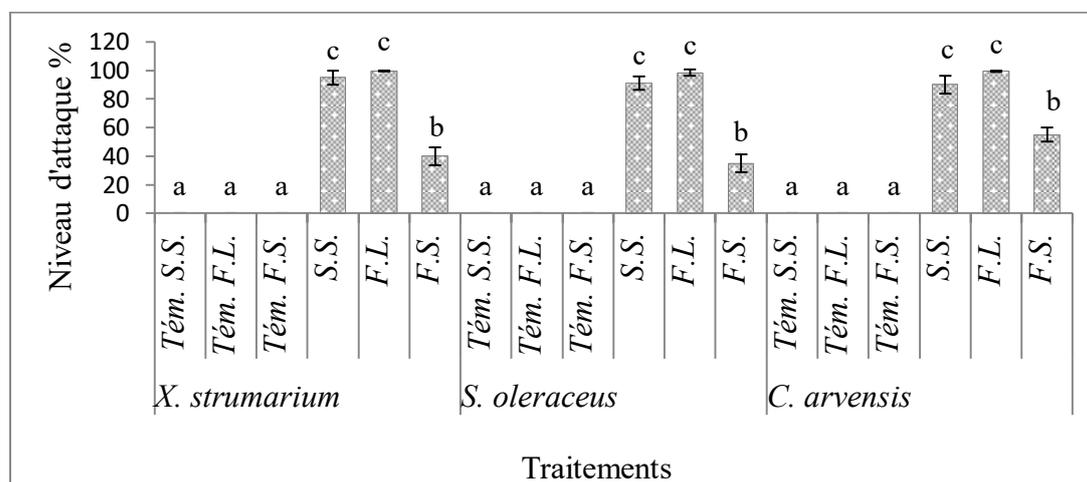


Figure 7. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3, S1 et C1 appliqués sous forme de suspension de spores (S.S.), de formulation liquide (F.L.) et de formulation solide (F.S.) sur les feuilles détachées de *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis* comparativement à leurs témoins (Tém.) respectifs non inoculés.

1.3. Effet d'*Alternaria alternata* isolat C1 sur les feuilles détachées de *Convolvulus althaeoides* et sur la germination des graines de *Cuscuta campestris* Yunker

1.3.1. Effet d'*A. alternata* isolat C1 sur les feuilles détachées de *Convolvulus althaeoides*

L'analyse de la variance ANOVA à un seul facteur a montré un effet très hautement significatif ($P < 0,001$) de la suspension de spores d'*A. alternata* isolat C1 sur les feuilles détachées de *C. althaeoides* qui ont montré une sévérité de maladie très importantes (98,2 %). Par contre, les feuilles détachées traitées avec l'EDS sont restées saines.

1.3.2. Effet d'*Alternaria alternata* isolat C1 sur la germination des graines de *Cuscuta campestris*

Le taux de germination des graines de *C. campestris* enrobées par la suspension de spores d'*A. alternata* isolat C1 (74,93%) ne diffère pas statistiquement du taux de germination des graines traitées avec l'EDS (77,11%). De même, la longueur des plantules de cuscute développées des graines inoculées par le champignon (4,31 cm) ne présente pas de différence significative avec celles des graines du témoin traitées avec l'EDS (4,79 cm).

2. Essais *in-vivo*

2.1. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1, de leurs formulations et de l'herbicide Mustang® sur la croissance de *Xanthium strumarium* et de *Sonchus oleraceus* en pots.

Les feuilles des plantules des deux adventices ont montré des symptômes de maladie 4 jours après leur inoculation avec la suspension de spores des isolats correspondant et de leurs formulations. Les symptômes sur les feuilles de *X. strumarium* sont sous forme de taches nécrotiques entourées de halos chlorotiques débutant à l'apex et à la périphérie des feuilles de la base (**Figure 8**). Quant aux feuilles de *S. oleraceus*, les symptômes se présentent sous forme de taches nécrotiques arrondies entourées d'un cercle noir qui s'élargit par la suite constituant une forme irrégulière (**Figure 9**).

L'analyse de la variance à un seul facteur a montré un effet très hautement significatif de la suspension de spores des deux isolats et de leurs formulations liquides ($P < 0,001$) sur la sévérité de la maladie des feuilles des deux adventices. De même, les suspensions de spores des deux isolats, de leurs formulations liquides, et de l'herbicide Mustang® à dose réduite ont eu un effet très hautement significatif sur les paramètres de croissance (longueur des plantes, longueur des racines et poids sec) de *X. strumarium* et de *S. oleraceus*. Les feuilles des deux adventices traitées à la suspension de spores et à la formulation liquide ont montré des niveaux élevés d'attaque par rapport aux feuilles traitées à la formulation solide (**Figure 10**).

Chez *X. strumarium* : l'herbicide Mustang® à dose réduite a montré la plus grande efficacité sur tous les paramètres de croissance (longueur des plantes, longueur des racines, et poids sec) suivi de la formulation liquide, puis la suspension de spores, mais statistiquement, le traitement l'herbicide Mustang® à dose réduite et le traitement formulation liquide appartiennent au même groupe (**Tableau 11; Figure 11**). Les résultats du traitement des plants avec la formulation solide ne sont pas significativement différents par rapport à leurs témoins respectifs concernant les trois paramètres de croissance. 24h après l'application de

l'herbicide Mustang® à dose réduite, les plants de cette adventice se courbent et commencent à se dessécher avec le temps.

Chez *S. oleraceus* : L'analyse de la variance à un seul facteur a montré que la suspension de spores, la formulation liquide et l'herbicide Mustang® à dose réduite ont eu un effet très hautement significatif ($P < 0,001$) sur tous les paramètres de croissance. L'effet sur la sévérité de maladie est plus marqué dans la formulation liquide suivi de la suspension de spores, ces deux derniers traitements appartiennent au même groupe mais leurs taux de réduction des paramètres de croissance par rapport à la formulation liquide varient : entre 42-45 % de réduction pour la longueur des tiges, 17-33 % pour la longueur des racines, et 68-73 % pour le poids sec (**Tableau 12; Figure 12**), le traitement avec la formulation solide ne présente pas de différence significative avec le témoin pour la longueur des racines. Les plants traités avec l'herbicide Mustang® à dose réduite présentent une croissance anormale se traduisant par une production élevée de feuilles sans élongation.

Tableau 11. Effet d'*Alternaria alternata* isolat X3, ses formulations et l'herbicide Mustang® à dose réduite sur les plantules de *Xanthium strumarium* en pots.

Traitements	Paramètres de croissance de <i>Xanthium strumarium</i>		
	Longueur des plants (cm)	Longueur des racines (cm)	Poids Sec (g)
Témoin S.S.	24,11±2,42 b	6,32±0,64 bc	1,62±0,11 bc
Témoin F.L.	26,07±1,70 b	7,11± 0,34 c	2,59±0,43 cd
Témoin F.S.	23,09±2,74 b	6,79±0,27 bc	2,53±0,45 cd
Suspension de spores (S.S.)	13,44±0,70 a	5,46±0,24 ab	0,98±0,16 ab
Formulation liquide (F.L.)	10,61±0,64 a	4,53±0,24 a	0,86±0,13 ab
Formulation solide (F.S.)	21,69±0,91 b	6,84±0,28 bc	1,72±0,20 c
Herbicide Mustang®	10,82±1,03 a	4,42±0,11 a	0,56±0,06 ab

Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes selon le test du Tukey au seuil de 5%. Les valeurs avec ± représentent l'erreur standard.

Tableau 12. Effet d'*Alternaria alternata* isolat S1, ses formulations et l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance des plantules de *Sonchus oleraceus* en pots.

Traitements	Paramètres de croissance de <i>Sonchus oleraceus</i>		
	Longueur des plants (cm)	Longueur des racines (cm)	Poids Sec (g)
Témoin S.S.	64,64±1,07 c	6,12±0,20 b	1,78±0,51 b
Témoin F.L.	60,31±0,71 c	5,74± 0,16 b	1,86±0,16 b
Témoin F.S.	62,28±2,96 c	6,18±0,20 b	3,44±0,23 c
Suspension de spores (S.S.)	10,85±1,35 a	2,72±0,27 a	1,16±0,17 ab
Formulation liquide (F.L.)	07,92±0,11 a	1,88±0,02 a	0,34±0,02 a
Formulation solide (F.S.)	28,04±2,35 b	4,86±0,45 b	1,88±0,39 b
Herbicide Mustang®	10,95±0,48 a	2,84±0,35 a	1,30±0,29 ab

Les valeurs de la même colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes selon le test du Tukey au seuil de 5%. Les valeurs avec ± représentent l'erreur standard.



Figure 8. Symptômes sur les feuilles des plantules de *Xanthium strumarium* commençant par l'apex et la périphérie, suite à l'inoculation par la suspension de spores d'*Alternaria alternata* isolat X3.



Figure 9. Symptômes sur les feuilles des plantules de *Sonchus oleraceus* suite à l'inoculation par la suspension de spores d'*Alternaria alternata* isolat S1.

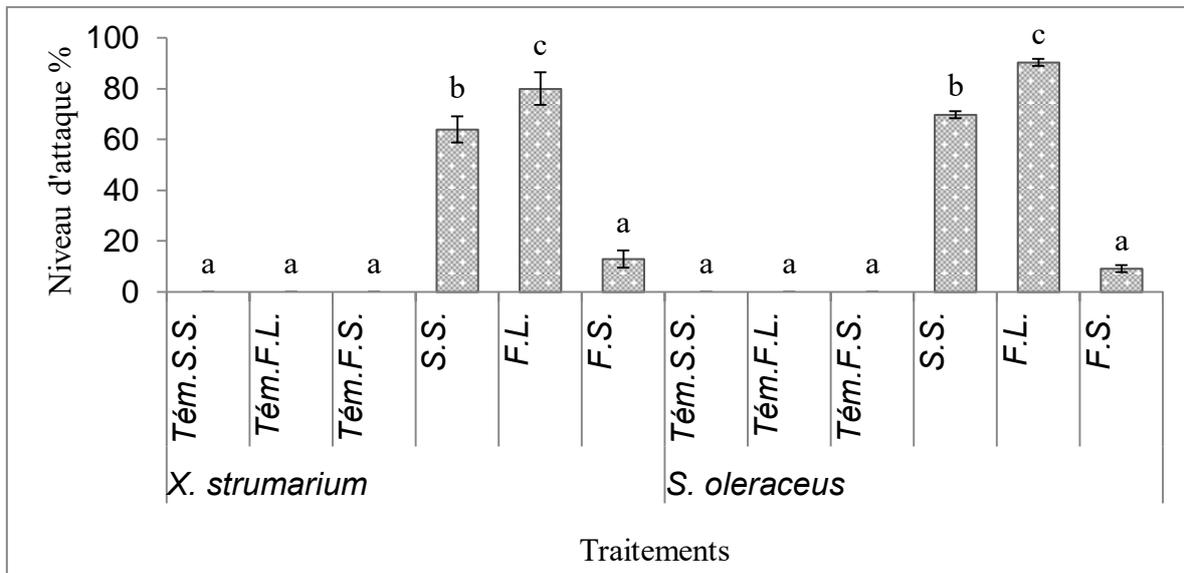


Figure 10. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1 appliqués sous forme de suspension de spores (S.S.), de formulation liquide (F.L.), et de formulation solide (F.S.), sur les feuilles des plantules de *Xanthium strumarium* et de *Sonchus oleraceus* comparativement à leurs Témoins (Tém.) respectifs non inoculés.

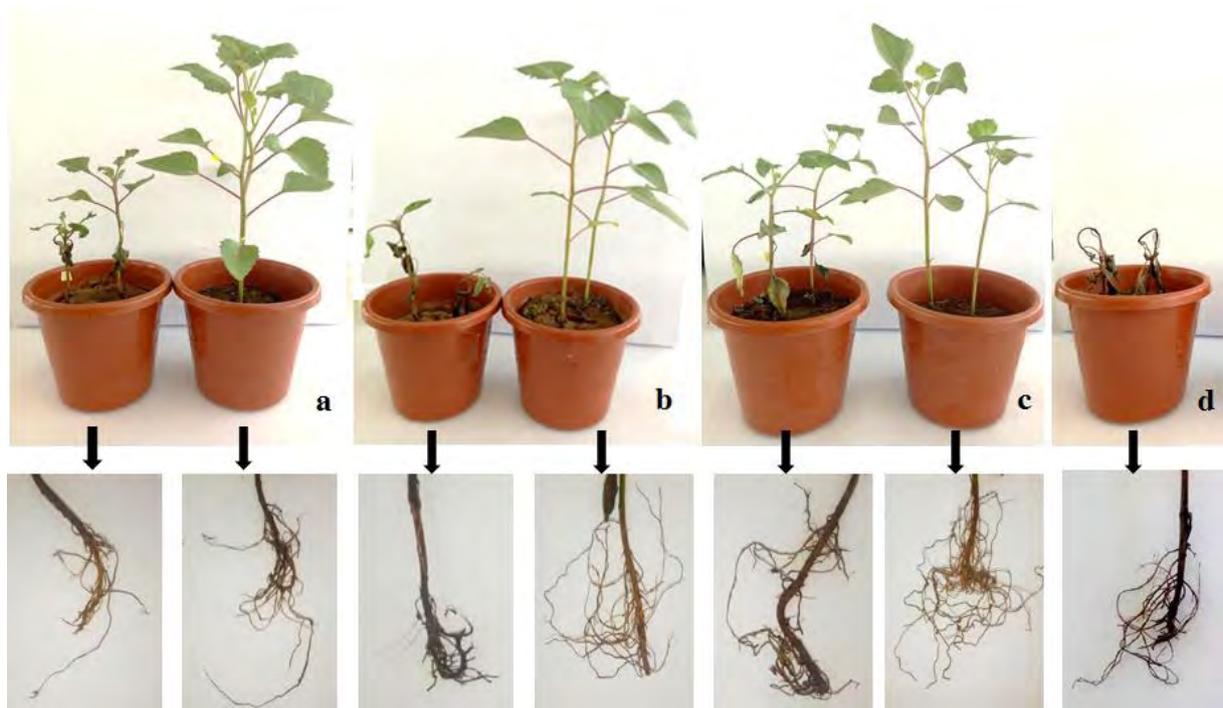


Figure 11. Aspect des plantules et des racines de *Xanthium strumarium* après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins sont les plantules à droite de chaque photo et sont respectivement (de a à c) : Eau distillée stérile, Formulation liquide sans spores, Formulation solide sans spores.



Figure 12. Aspect des plantules de *Sonchus oleraceus* après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins sont les plantules à droite de chaque photo et sont respectivement (de a à c) : Eau distillée stérile, Formulation liquide sans spores, Formulation solide sans spores.

3. Essais *in-situ*

3.1. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1, de leurs formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance de *Xanthium strumarium* et de *Sonchus oleraceus* au champ.

Les feuilles des plantules des deux adventices ont montré des symptômes de maladie 5 jours après leur inoculation avec la suspension de spores des deux isolats et leurs formulations correspondantes. L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif ($P < 0,001$) de la suspension de spores des deux isolats et de leurs formulations liquides sur la sévérité de la maladie des feuilles des deux adventices (**Figure. 13**). Les suspensions de spores, leurs formulations liquide et solide ainsi que l'herbicide à dose réduite ont eu un effet très hautement significatif sur les paramètres de croissance : longueur des plantes, longueur des racines et poids sec de *X. strumarium* et de *S. oleraceus*.

Concernant *X. strumarium* l'analyse de la variance a montré que la sévérité de la maladie a été modérément élevée chez les feuilles des plantules traitées avec la formulation liquide et la suspension de spores durant les deux périodes d'essais en champ (**Figure 13**).

L'herbicide Mustang® à dose réduite a montré la plus grande efficacité sur les paramètres de croissance (longueur des plantes, longueur des racines et poids sec), suivi de la formulation liquide, de la suspension de spores puis de la formulation solide durant les deux périodes d'essais au champ (2017 et 2018) (**Tableau 13; Figure 14**). Un jour après l'application de l'herbicide Mustang®, les plants de cette adventice se courbent et commencent à se dessécher avec le temps.

Les paramètres de croissance et la sévérité de la maladie étaient significativement différents entre les périodes d'essai (2017 et 2018) pour tous les traitements avec le champignon. Par contre, la différence n'était pas significative pour l'herbicide Mustang® à dose réduite.

Dans le cas de *S. oleraceus*, l'analyse de la variance a montré que tous les traitements ont eu un effet très hautement significatif, la sévérité de la maladie a été élevée dans les trois traitements : la formulation liquide puis la suspension de spores et la formulation solide.

L'herbicide Mustang® à dose réduite a montré la plus grande efficacité sur les paramètres de croissance (longueur des plantes, longueur des racines et poids sec), suivi de la formulation liquide, de la suspension de spores puis de la formulation solide (**Tableau 14 ; Figures 15**).

Tableau 13. Effet d'*Alternaria alternata* isolat X3, de ses formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance des plantules de *Xanthium strumarium* au champ.

Traitements	Année	Paramètres de croissance		
		Longueur des plants (cm)	Longueur des racines (cm)	Poids Sec (g)
Témoin S.S.	2017	21,31±0,42 d	09,79±0,32 e	53,34±5,84 bc
	2018	52,56±0,87 h	12,28±0,20 f	133,49±1,00 g
Témoin F.L.	2017	20,52±1,27 d	10,14±0,33 e	53,85±2,69 bc
	2018	51,76±0,24 h	12,07±0,23 f	131,25±1,32 g
Témoin F.S.	2017	21,26±0,61 d	09,72±0,31 e	53,34±1,91 bc
	2018	53,31±0,92 h	12,42±0,49 f	117,35±15,66 fg
Suspension de spores (S.S.)	2017	16,57±0,38 bc	05,89±0,10 bc	41,71±0,92 b
	2018	35,85±0,66 f	07,44±0,22 d	82,98±1,61 de
Formulation liquide (F.L.)	2017	15,12±0,35 b	05,19±0,23 ab	32,80±0,80 b
	2018	31,00±0,49 e	05,88±0,42 bc	72,66±0,37 cd
Formulation solide (F.S.)	2017	19,84±1,19 cd	06,80±0,33 cd	46,54±0,45 b
	2018	41,46±0,72 g	10,20±0,27 e	100,65±1,77 ef
Herbicide Mustang®	2017	05,73±0,30 a	03,92±0,25 a	08,03±0,88 a
	2018	07,10±0,41 a	03,87±0,19 a	09,48±0,53 a

Les valeurs d'une même colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes selon le test de Tukey au seuil de 5%. Les valeurs avec ± représentent l'erreur standard.

Tableau 14. Effet d'*Alternaria alternata* isolat S1, de ses formulations et de l'herbicide Mustang® à dose réduite sur la croissance des plantules de *Sonchus oleraceus* au champ.

Traitements	Paramètres de croissance		
	Longueur des plants (cm)	Longueur des racines (cm)	Poids Sec (g)
Témoin S.S.	70,22±1,65 e	13,94±0,90 e	1,90±0,01 e
Témoin F.L.	68,31±1,65 e	14,80±0,40 e	1,94±0,06 e
Témoin F.S.	75,76±1,65 e	13,89±0,46 e	1,98±0,06 e
Suspension de spores (S.S.)	50,48±1,65 c	08,08±0,32 c	1,31±0,02 b
Formulation liquide (F.L.)	40,76±1,65 b	07,16±0,27 bc	1,22±0,01 b
Formulation solide (F.S.)	58,12±1,65 d	11,61±0,25 d	1,62±0,02 c
Herbicide Mustang®	23,66±1,65 a	05,74±0,17 ab	0,62±0,02 a

Les valeurs d'une même colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes selon le test de Tukey au seuil de 5%. Les valeurs avec ± représentent l'erreur standard.

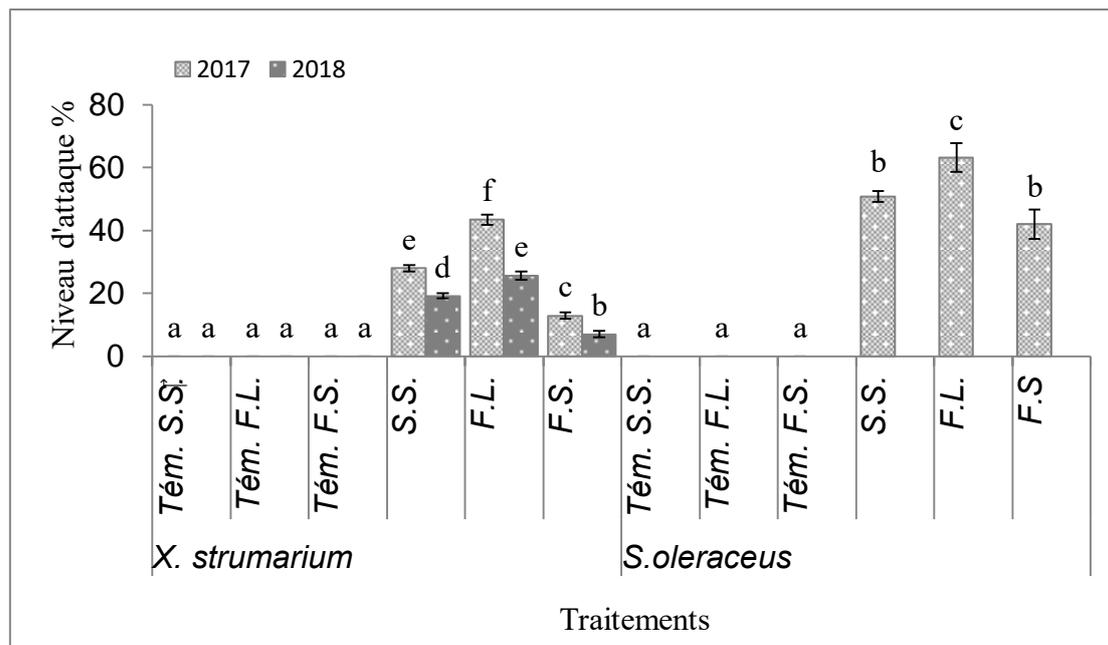


Figure 13. Effet d'*Alternaria alternata* isolats X3 et S1 appliqués sous forme de suspension de spores (S.S.), de formulation liquide (F.L.) et de formulation solide (F.S.) sur les feuilles des plantules de *Xanthium strumarium* et de *Sonchus oleraceus* comparativement à leurs témoins (Tém.) respectifs non inoculés.



Figure 14. Aspect des plantules de *Xanthium strumarium* après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins (de e à g) sont : (e) Eau distillée stérile, (f) Formulation liquide sans spores, (g) Formulation solide sans spores.



Figure 15. Aspect des plantules de *Sonchus oleraceus* après inoculation par la suspension de spores (a), la formulation liquide (b), la formulation solide (c) et l'herbicide Mustang® à dose réduite (d). Les témoins (de e à g) sont : (e) Eau distillée stérile, (f) Formulation liquide sans spores, (g) Formulation solide sans spores.

4. Gamme d'hôte

Toutes les feuilles détachées et les plantules de la gamme d'hôtes (tomate, blé, fève et courgette) inoculées par la suspension de spores des trois isolats d'*A. alternata* X3, S1 et C1 n'ont présenté aucun symptôme de maladie. Par contre, et à titre comparatif, les feuilles détachées de *X. strumarium*, de *S. oleraceus*, de *C. arvensis* ainsi que les plantules de *X. strumarium* et de *S. oleraceus* traitées en même temps et dans les mêmes conditions que la gamme d'hôtes ont été affectées par leurs isolats correspondants.

VI. Discussion

Les résultats obtenus ont montré que la formulation liquide à base d'huile de colza a augmenté l'efficacité des spores dans les conditions contrôlées ainsi qu'au champ. Ceci est en accord avec l'effet rapporté dans des études antérieures (Babu et al., 2003 ; Siddiqui et al., 2010) où une émulsion à base d'huile de colza a été utilisée avec les spores d'*Alternaria alternata* contre *Chenopodium album* et *Eichhornia crassipes*. Auld (1999) a testé une série d'huiles végétales (colza, arachide, carthame, soja, maïs et tournesol) comme formulations liquides pour *Colletotrichum orbiculare* contre *Xanthium spinosum* et a constaté que la meilleure formulation était celle à base d'huile de colza.

Inversement, la formulation solide des trois champignons dans la présente étude n'a pas augmenté leur efficacité à l'égard de leurs adventices cibles sous serre et en plein champ, contrairement à l'effet significatif d'*A. solani* contre *Chenopodium murale* obtenu par Abdel-Fattah (2002).

Dans les expérimentations au champ, les paramètres de croissance de *X. strumarium* (en particulier la hauteur et le poids sec de la plante) ainsi que la sévérité de la maladie ont été dans l'ensemble beaucoup plus élevés pendant l'essai mené en 2018 qu'en 2017, que ce soit dans les traitements inoculés ou non inoculés. Les données climatiques présentées dans le tableau 8 montrent des températures moyennes similaires pendant les deux périodes d'essai, mais des conditions pluviométriques plus favorables en 2018 qu'en 2017 (20 mm de pluie supplémentaire). Ces conditions climatiques favorables ont très probablement eu un effet positif sur la croissance des plantes pendant la période d'essai en 2018. Les conditions climatiques pourraient également avoir amélioré la performance du champignon sachant que la plupart des pathogènes évalués comme mycoherbicides ont besoin d'humidité libre pour germer, pénétrer, infecter et tuer l'adventice cible (Boyette et al., 1996).

Dans l'ensemble, pour le travail décrit ici, nous n'avons obtenu qu'un contrôle partiel des deux adventices puisque le traitement avec la formulation à base d'huile des isolats X3 et

S1 d'*A. alternata* a réduit la biomasse sèche de *X. strumarium* et *S. oleraceus* à environ la moitié de celle du témoin non traité. Ce potentiel peut toutefois être accru par l'utilisation d'inoculum et de formulations plus efficaces ou par la combinaison de l'agent pathogène avec d'autres méthodes de lutte. Il a été démontré que le type d'inoculum influence l'efficacité de l'agent du biocontrôle. Dans la plupart des études menées sur l'évaluation d'*A. alternata* comme agent de biocontrôle contre plusieurs adventices, les conidies ont été utilisées comme inoculum. Cependant, dans une étude menée par Qiang et al. (2006), il a été trouvé que le mycélium de la souche 501 d'*A. alternata* causait plus de dégâts à l'adventice envahissante *Eupatorium adenophorum* que les conidies. Il a été suggéré que le mycélium est plus approprié comme propagules d'infection pour ce champignon (*A. alternata*) pour le contrôle des adventices.

D'autres évaluations peuvent également inclure des essais de formulations plus efficaces pour améliorer le potentiel de lutte biologique contre les champignons. Boyette et al. (1993) ont découvert que le potentiel du mycoherbicide à base de *Colletotrichum truncatum* pour contrôler la sesbanie du chanvre (*Sesbania exaltata*) dans les conditions de terrain pouvait être augmenté en formulant l'agent pathogène sous forme d'émulsion inversée. Cette émulsion est constituée d'eau en suspension dans l'huile, contrairement à une émulsion standard, comme celle utilisée dans la présente étude, dans laquelle l'huile est en suspension dans l'eau. Les formulations inversées présentent de plus grandes propriétés de rétention d'eau et devraient donc améliorer le potentiel de biocontrôle des champignons mycoherbicides en réduisant les besoins en humidité.

Les champignons évalués dans la présente étude peuvent également nécessiter des essais plus complets pour s'assurer qu'aucun effet néfaste sur l'environnement, y compris la toxicité pour les animaux et les autres plantes non cibles, ne peut se produire. L'évaluation de la spécificité parasitaire dans des conditions contrôlées a révélé que les isolats X3, S1 et C1 d'*A. alternata* n'affectent pas les espèces végétales testées, à savoir le blé, la tomate, la fève et la courgette, c'est également le cas de plus de 50 espèces de plantes cultivées dont des céréales, des légumineuses, des oléagineux, des légumes et des arbres fruitiers testés avec d'autres isolats d'*A. alternata* par d'autres auteurs (**Annexe 02**). Des formes spécifiques à l'hôte d'*A. alternata* ont été signalées et désignées comme pathotypes (Nishimura & Kohmoto, 1983 ; Takao et al., 2016). Leur spécificité a été attribuée aux toxines spécifiques de l'hôte (HST) qu'elles produisent. Nous pouvons donc supposer que les isolats testés, y

compris les nôtres, pourraient produire des HST spécifiques à leurs hôtes cibles. La question nécessite néanmoins des recherches complémentaires.

Cependant, même si l'infection non ciblée des agents mycoherbicides est indésirable, les isolats à large spectre capables de supprimer de multiples adventices auront des meilleures chances d'être développés en mycoherbicides. La spécificité à l'hôte de nombreux pathogènes des adventices est considérée comme un obstacle à la commercialisation des bioherbicides (Auld & Morin, 1995 ; Kremer, 2005). L'une des stratégies permettant de surmonter ce problème est la "stratégie des agents pathogènes multiples" (Chandramohan & Charudattan, 2003 ; Charudattan, 2001) qui consiste à combiner deux ou plusieurs agents pathogènes pour contrôler plusieurs espèces d'adventice. Un exemple de tentatives réussies, est l'utilisation d'un mélange de trois champignons indigènes de Floride, *Drechslera gigantea*, *Exserohilum longirostratum* et *Exserohilum rostratum* isolés de trois adventices hôtes différentes, pour lutter contre sept adventices des vergers d'agrumes en Floride (Chandramohan et al., 2002).

Dans la présente étude, les isolats X3 et S1 d'*A. alternata* ont été évalués principalement sur les adventices à partir desquelles ils ont été isolées. Une évaluation complémentaire sur d'autres espèces d'adventices du même genre et/ou de la même famille est nécessaire, ainsi que la combinaison du champignon avec d'autres pathogènes spécifiques à leurs hôtes.

L'élargissement du spectre de lutte contre les adventices peut également nécessiter l'intégration d'autres méthodes de lutte. Kremer (2005) a affirmé que les bioherbicides pourraient être plus efficaces en tant que composante d'un programme de gestion global plutôt que comme approche unique, et a examiné plusieurs scénarios de combinaisons, y compris l'intégration avec les doses recommandées ou réduites d'herbicides. Dans la présente étude, l'effet d'une dose réduite de l'herbicide Mustang® a été testé dans la perspective de sa combinaison avec les champignons dans nos travaux ultérieurs, l'application d'une dose réduite (0,45 L/ha, soit 75 % de la dose préconisée) de l'herbicide Mustang® sur les plantules de *X. strumarium* et *S. oleraceus* a fortement réduit leurs paramètres de croissance, ce qui est conforme aux résultats d'Auskalnis & Kadzys (2006) qui ont montré que le Mustang® à la même dose était très efficace contre les adventices. Plusieurs études ont déjà suggéré la combinaison d'herbicides à dose réduite et de pathogènes végétaux pour améliorer l'activité des mycoherbicides sur les adventices et pour minimiser les impacts chimiques sur l'environnement et les espèces non ciblées (Hoagland, 1996 ; Nelson & Shearer, 2005 ; Peng & Byer, 2005).

I. Introduction

Alternaria est un genre fongique cosmopolite largement répandu dans le sol et la matière organique. Il comprend des espèces saprophytes, endophytes et pathogènes (Lou et al., 2013 ; Meena et al., 2017 a). Les espèces d'*Alternaria* ont la capacité de produire une variété de métabolites secondaires (Andersen et al., 2015) où quelques 268 métabolites ont été signalés au cours des dernières décennies. Les métabolites d'*Alternaria* peuvent être regroupés en plusieurs catégories, notamment les composés azotés, les stéroïdes, les terpénoïdes, les pyranones (pyrones), les quinones, les substances phénoliques, etc. Nombre de ces métabolites secondaires sont soit des mycotoxines, soit des phytotoxines (Patriarca et al., 2019).

Les espèces d'*Alternaria* produisent plus de 70 mycotoxines (Meena & Samal, 2019), plusieurs d'entre-elles produisent également diverses phytotoxines qui sont spécifiques à l'hôte (HST) et non spécifiques à l'hôte (nHST) selon leurs stades physiologiques et morphologiques (Thomma, 2003 ; Meena & Samal, 2019). Plusieurs études ont démontré que le profil biochimique des métabolites était un outil fiable pour caractériser et différencier les champignons phytopathogènes (Siciliano et al., 2018). Les métabolites secondaires microbiens peuvent être exploités comme herbicides (Kenfield et al., 1988 ; Abbas & Duke, 1995 ; Saxena & Pandey, 2001 ; Evidente et al., 2011) et leur utilisation pourrait constituer une approche alternative prometteuse pour concevoir des herbicides sans danger pour l'environnement. Leur utilisation peut également résoudre les problèmes de limitation de l'utilisation des microorganismes vivants tels que : la spécificité des microorganismes qui induit une limitation de la commercialisation, le problème de stockage, la difficulté d'application, le temps d'action, la viabilité et l'influence des conditions environnementales.

Plusieurs études ont été menées pour évaluer le potentiel herbicide des métabolites secondaires d'origine fongique sur les adventices (Vurro et al., 1998 ; Evidente et al., 2009 ; Sanodiya et al., 2010). Certains métabolites secondaires d'*Alternaria alternata* sont dotés d'un potentiel herbicide (Davis et al., 1977 ; Sanodiya et al., 2009). Les effets de ces phytotoxines se font principalement sur différentes parties des cellules végétales comme les mitochondries, le chloroplaste, la membrane plasmique, le complexe de Golgi, le noyau, etc (Meena et al., 2017). L'acide ténuazonique (TeA) est l'un des principaux composés produits par certaines espèces d'*Alternaria* (Alexander et al., 2011) et il est le plus toxique (Yun et al., 2015). Le TeA présente des propriétés biologiques, notamment les activités anti-tumorales,

antibactériennes, antivirales et phytotoxiques (Miller, 1963 ; Gitterman, 1965 ; Lebrun, 1988). Il est également connu pour son activité herbicide à large spectre (Chen & Qiang, 2017).

Le but de cette étude est : i) d'identifier (au moyen de la HPLC-MS) et de comparer les profils biochimiques des métabolites secondaires obtenus à partir des trois isolats d'*Alternaria alternata* (isolats X3, S1, C1) isolés de feuilles malades prélevées de leurs adventices cibles, à savoir *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis* (Abdessemed et al., 2019 a, b) et, ii) d'évaluer leur potentiel mycoherbicide sur les feuilles détachées des trois adventices hôtes.

II. Matériel et Méthodes

1. Obtention des métabolites secondaires

L'obtention des fractions de métabolites secondaires a été réalisée selon les étapes suivantes :

1.1 Cultures liquides

Les cultures liquides ont été réalisées comme suit : **1)** préparation de deux quantités de bouillon de pomme de terre (PDB) dont la composition est en **annexe 1.2**, **2)** 2000 ml et 20 ml de PDB, respectivement placés dans des Erlen-Meyer de 5000 ml et 50 ml, **3)** inoculation des deux milieux liquides avec des explants d'*A. alternata* âgées de 7 jours, **4)** incubation statique des cultures fongiques pendant 21 jours sous les conditions du laboratoire (Wang et al., 2014 ; Kaur et al., 2015).

1.2. Filtration

Après 21 jours d'incubation, chaque quantité de culture a été filtrée à travers un entonnoir muni d'une passoire et d'un tissu à mailles serrées (pour éliminer le mycélium), puis à l'aide de micro-filtre stériles de 0,20 µm, une seconde filtration a été réalisée, seulement pour les filtrats de cultures issus des cultures de 20 ml (destinés à l'analyse chimique par HPLC/MS). Les filtrats de culture récupérés ont été placés dans des bocaux et conservés à une température de -20 °C au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

1.3. Extraction et concentration des extraits organiques

Les étapes suivantes ont été réalisées : **1)** Extraction des métabolites secondaires à partir des filtrats de culture à l'aide d'éthyle d'acétate (solvant organique) en trois fois et à volumes égaux (filtrats de culture et éthyle d'acétate) dans une ampoule à décompter, **2)** récupération de la phase organique (solvant-métabolites secondaires) dans des Erlen-Meyer après la

décantation des deux phases (organique et aqueuse), **3**) Addition d'une petite quantité de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) au mélange solvant-métabolites secondaires pour éliminer l'eau, **4**) concentration des extraits organiques et évaporation du solvant à l'aide du rotavapor sous pression normale et à 40 °C (Qiang et al., 2010), **5**) transfert des extraits bruts obtenus après l'évaporation du solvant dans de petits flacons de chromatographie, propres et pesés, après leur avoir ajouté une petite quantité d'éthyle acétate ou du méthanol, **6**) séchage des extraits bruts par évaporation du solvant avec l'azote gazeux, et pesage des flacons contenant les métabolites secondaires.

1.4 Fractionnement des extraits bruts

Pour le fractionnement, les étapes suivantes ont été effectuées : **1**) dépôt des extraits bruts sur plusieurs petites plaques de chromatographie à couche mince en aluminium (la plaque de CCM a été coupée en plusieurs petits fragments), **2**) dépôt des petites plaques dans de petits bacs de chromatographie en verre contenant une série de mélanges de solvants (éluant), **3**) après migration, visualisation des plaques sous lampe UV afin de choisir les meilleurs éluants qui seront par la suite utilisés pour fractionner les extraits bruts dans la colonne de chromatographie.

1.4.1 Fractionnement des extraits bruts dans la colonne chromatographique

Le fractionnement sur colonne chromatographique s'est déroulé selon les étapes suivantes : **1**) solubilisation de l'extrait brut avec une petite quantité d'éthyle acétate et de méthanol ou avec une petite quantité de silice et de solvants (si l'extrait n'est pas soluble dans l'un des constituants de l'éluant), **2**) préparation des mélanges de solvants avec des proportions différentes et convenables pour l'extrait brut de chaque isolat (**Tableau 15**), **3**) choix de la taille de la colonne en fonction de la quantité des métabolites et du nombre de bandes visualisées sous lumière UV (la colonne utilisée pour le fractionnement des trois isolats est de 60 cm de longueur et de 0,5 cm de diamètre), **4**) remplissage de la colonne avec le premier mélange solvants-silice, **5**) versement de l'extrait brut dans la colonne chromatographique à l'aide d'une pipette de Pasteur s'il s'agit du solvant-métabolites secondaires ou avec du papier aluminium s'il s'agit de silice-métabolites secondaires, **6**) collection des fractions métaboliques avec des volumes plus ou moins égaux dans des tubes collecteurs.

Toutes les fractions récupérées ont été déposées sur une ligne sur une plaque de CCM en aluminium et mises dans une cuve contenant le même éluant utilisé dans la colonne chromatographique afin de voir leur profil chromatographique et rassembler celles qui se

trouvent au même niveau de migration (chloroforme/méthanol (95 : 5) pour les isolats d'*A. alternata* X3 et S1 et éthyle acétate /éther de pétrole (3 : 7) pour *A. alternata* isolat C1).

Les fractions de même niveau de migration obtenues de l'extrait brut issu de filtrat de culture d'*A. alternata* isolats X3 et S1 ont été mises une seconde fois sur une plaque CCM en aluminium dans une cuve contenant le premier éluant, certaines fractions d'*A. alternata* isolat C1 dont le rapport de migration était faible ont été immergées dans un mélange d'éthyle acétate /éther de pétrole (3 : 7) et d'autres dans un mélange de chloroforme/méthanol (95 : 5). Le poids de chaque fraction a été noté.

Tableau 15. Proportions de solvants utilisées comme éluant dans le fractionnement des trois extraits bruts par la colonne chromatographique.

Éluents utilisés pour le fractionnement	Volume (ml)	Isolats d' <i>Alternaria alternata</i>		
		X3	S1	C1
Chloroforme/méthanol (95 : 5)	100	+	+	
Chloroforme/méthanol (90 : 10)	100	+	+	
Chloroforme/méthanol (80 : 20)	100	+	+	
Méthanol	50	+	+	
Acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 9)	50			+
Acétate d'éthyle/éther de pétrole (2 : 8)	50			+
Acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 1)	100			+
Acétate d'éthyle/éther de pétrole (8 : 2)	100			+
Acétate d'éthyle/éther de pétrole (9 : 1)	100			+
Acétate d'éthyle	100			+
Méthanol	100			+

2. Méthode d'HPLC-MS utilisée pour l'identification des composants des filtrats de culture des trois isolats fongiques et de leurs fractions obtenues

La méthode d'HPLC-MS utilisée pour l'identification des composants des filtrats de culture des trois isolats fongiques et de leurs fractions obtenues a été développée à l'aide d'une HPLC 1260 Infinity Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) couplée à un spectromètre de masse Q-TOF modèle G6540B (Agilent Technologies) avec une source à double ionisation par électrospray (ESI) et équipé d'un système DAD (Agilent Technologies). Une colonne Ascentis® Express C18 (2,7 µm, 50 mm x 3,0 mm de diamètre intérieur, Supelco©, Bellefonte, PA, USA) a été utilisée pour les séparations. Le débit a été réglé à 0,40 mL/min. Les métabolites ont été élués à température constante de 37 °C, en utilisant un gradient linéaire composé de A : 0,1 % (v/v) d'acide formique (FA) dans H₂O et B : 0,1 %

(v/v) de FA dans l'acétonitrile (ACN). La pente était la suivante : condition de départ 95 A% et 5% B, 0 min, 0 % A et 100 % B en 6 min et 8 min, maintenue à 95 % A et 5 % B pendant 9 min et 10 min. Les spectres UV ont été collectés par DAD toutes les 0,4 s de 190 à 750 nm avec une résolution de 2 nm. Les paramètres MS ont été réglés avec le logiciel d'acquisition de données (Agilent MassHunter, rév. B.05.01). L'instrument fonctionnait en mode positif, sous forme d'ions $[M+H]^+$; les spectres de SM ont été enregistrés en mode centroïde, avec une plage de masse m/z de 50-1700. Le volume de l'échantillon injecté était de 7 μ L. Afin d'effectuer une correction de masse de verrouillage en temps réel, une pompe Isocratic (1260 Infinity Series, Agilent Technologies) a été utilisée pour infuser une solution standard composée de deux composés de masse de référence : purine ($C_5H_4N_4$, m/z 121.050873, 10 μ mol/L) et hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxy)-phosphazene ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$, m/z 922.009798, 2 μ mol/L). Le débit a été réglé à 0,06 mL/min tandis que la fenêtre de détection et la hauteur minimale ont été réglées à 1000 ppm et 10000 points, respectivement, pour la correction de la masse de référence.

3. Évaluation de l'effet des extraits bruts d'*A. alternata* isolats X3, S1 et C1 et de leurs fractions sur les feuilles détachées de leurs adventices cibles

Le matériel végétal utilisé dans ce chapitre consiste en des feuilles détachées des trois adventices (*Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis*) collectées de la station expérimentale de l'ENSA.

Les tests sur les feuilles détachées des trois adventices ont été effectués comme suit : **1)** les feuilles désinfectées (comme décrit dans le chapitre 2) ont été placées dans des boîtes de Pétri (9 cm de diamètre, 2 feuilles par boîte), **2)** Pour chaque adventice, les feuilles blessées (dix petites blessures ont été réalisées à l'aide d'une aiguille fine et stérile sur toute la surface du limbe) et non blessées ont été traitées chacune avec 50 μ L de l'extrait brut et des fractions de l'isolat correspondant à une concentration de 0,1 mg/ml (l'extrait brut et les fractions ont été dilués dans une quantité de méthanol dont la concentration est de 2 %), **3)** les feuilles traitées à l'EDS et au méthanol à 2 % sont utilisées comme témoins (Evidente et al., 2011), **4)** les feuilles ont été par la suite incubées à une température de 25 °C et à une humidité relative (HR) de 60 % dans les conditions du laboratoire, **5)** Les notations ont été faites dès l'apparition des symptômes et jusqu'à la fin du test (4^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jours pour les feuilles de *C. arvensis*, *S. oleraceus* et *X. strumarium* respectivement), **6)** L'estimation de la sévérité des extraits bruts et des fractions testés est basée sur une échelle de notation de 0 à 5 comme suit: 0 : 0 – 4 %: aucun effet, 2 – 19 %: chlorose légère, 20 – 49 %: chlorose marquée

et légère nécrose, 50 – 79 % : chlorose aiguë et nécrose marquée, 80 – 94 %: chlorose et nécrose élevées, 95 – 100 % : chlorose et nécrose aiguë (Sanodiya et al., 2010).

Après le premier test avec les trois extraits bruts et toutes les fractions sur les feuilles détachées blessé et non blessés des adventices cibles, une sélection de fractions a été faite sur la base de l'apparition des symptômes sur les feuilles détachées ; ces fractions ont fait l'objet d'un 2^{ème} test de confirmation en augmentant les répétitions à 3 (avec 2 feuilles par boîte).

4. Traitements statistiques

Les essais ont été menés selon un dispositif en blocs aléatoires complets. 3 répétitions ont été réalisées pour chaque traitement, Les données des essais menés au laboratoire ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA uni-factorielle) Les moyennes ont été comparées en utilisant le HSD de Tukey à $P \leq 0,05$ en utilisant le logiciel STATISTICA (Statistica version 8,5, année 2014).

III. Résultats

1. Comparaison biochimique des trois isolats C1, S1 et X3 d'*Alternaria alternata*

Les extraits bruts des filtrats de cultures des trois isolats d'*A. alternata* ont montré des différences en termes de poids, de nombre de fractions récupérées et de profil biochimique. Ainsi, le nombre de composés détectés dans les extraits bruts était de 30, 31, 21 composés (identifiés et non identifiés) détectés respectivement dans les isolats d'*A. alternata* C1, S1 et X3.

Le fractionnement des extraits bruts des isolats d'*A. alternata* C1, S1 et X3 a donné respectivement 10, 7 et 8 fractions de métabolites (**Tableau 16**).

Tableau 16. Poids des extraits bruts et fractions des filtrats de cultures des trois isolats d'*Alternaria alternata*.

Poids (mg)	Isolats d' <i>Alternaria alternata</i>		
	C1	S1	X3
Extraits bruts	93,0	171,0	70,2
Fractions	a ₁ = 17,5 b ₁ = 01,7 c ₁ = 00,5 d ₁ = 01,3 e ₁ = 01,9 f ₁ = 01,4 g ₁ = 02,0 h ₁ = 04,1 i ₁ = 38,8 j ₁ = 03,8	a ₂ = 03,0 b ₂ = 17,5 c ₂ = 68,2 d ₂ = 68,6 e ₂ = 01,0 f ₂ = 13,5 g ₂ = 01,5	a ₃ = 08,8 b ₃ = 01,8 c ₃ = 24,3 d ₃ = 00,9 e ₃ = 00,7 f ₃ = 02,4 g ₃ = 08,2 h ₃ = 22,5

1.1. Identification des métabolites par HPLC-MS

1.1.1. Composition biochimique des filtrats de cultures

L'analyse biochimique des filtrats de culture des isolats d'*A. alternata* C1, S1 et X3 par HPLC-SM a révélé la présence de 15 composants répartis différemment dans les filtrats de cultures des trois isolats (**Tableau 17**). D'après le chromatogramme de la figure 16, on peut voir que l'acide ténuazonique (TeA) (temps de rétention = 5,5 min) représente le principal composant dans les filtrats de culture des trois isolats avec des quantités plus ou moins différentes.

La Cyclo-l-Prolylglycine (TR = 0,90 min), le Verrol (TR = 5,46 min), le Brassicène F (TR = 5,54 et 5,66 min) et la Rezishanone C (TR = 5,69 min) sont également des composants communs aux trois filtrats de cultures mais en petites quantités. Le Brassicène D est un composant commun aux filtrats de culture des isolats C1 et S1 d'*A. alternata*. Les composants: 12-Méthoxycitromycine (TR = 4,89 min), Erythroglaucine (TR = 4,90 min), Acide Alternarian (TR = 5,16 min), TAN 913 (TR = 4,97 min), Chaetoquadrin E (TR = 6,71 min) et Acide Tanzawaic F (TR = 7, 41 min) ne se trouvent que dans le filtrat de culture de l'isolat C1; tandis que la Cytosporine C (TR = 6,46 min) et la Striatosporine A (TR = 6,461 min) ne se trouvent que dans le filtrat de culture de l'isolat S1 d'*A. alternata*. De même, le

Cyclo-(Pro-Ala) n'est présent que dans le filtrat de culture de l'isolat X3 d'*A. alternata* (Tableau 17).

Tableau 17. Les composants des filtrats de cultures des isolats C1, S1 et X3 d'*Alternaria alternata*.

Composants	C1	S1	X3
Cyclo-l-Prolylglycine	+	+	+
12Methoxycitromycin	+		
Erythroglaucin	+		
Alternarian acid	+		
TAN 913	+		
Verrol(Terpene)	+	+	+
Tenuazonic acid	+	+	+
Brassicene F	+	+	+
Rezishanone C (=sorbivinetone)	+	+	+
Brassicene D	+	+	
Chaetoquadrin E	+		
Tanzawaic acid F	+		
Cytosporin C		+	
Striatosporin		+	
Cyclo-(Pro-Ala)			+

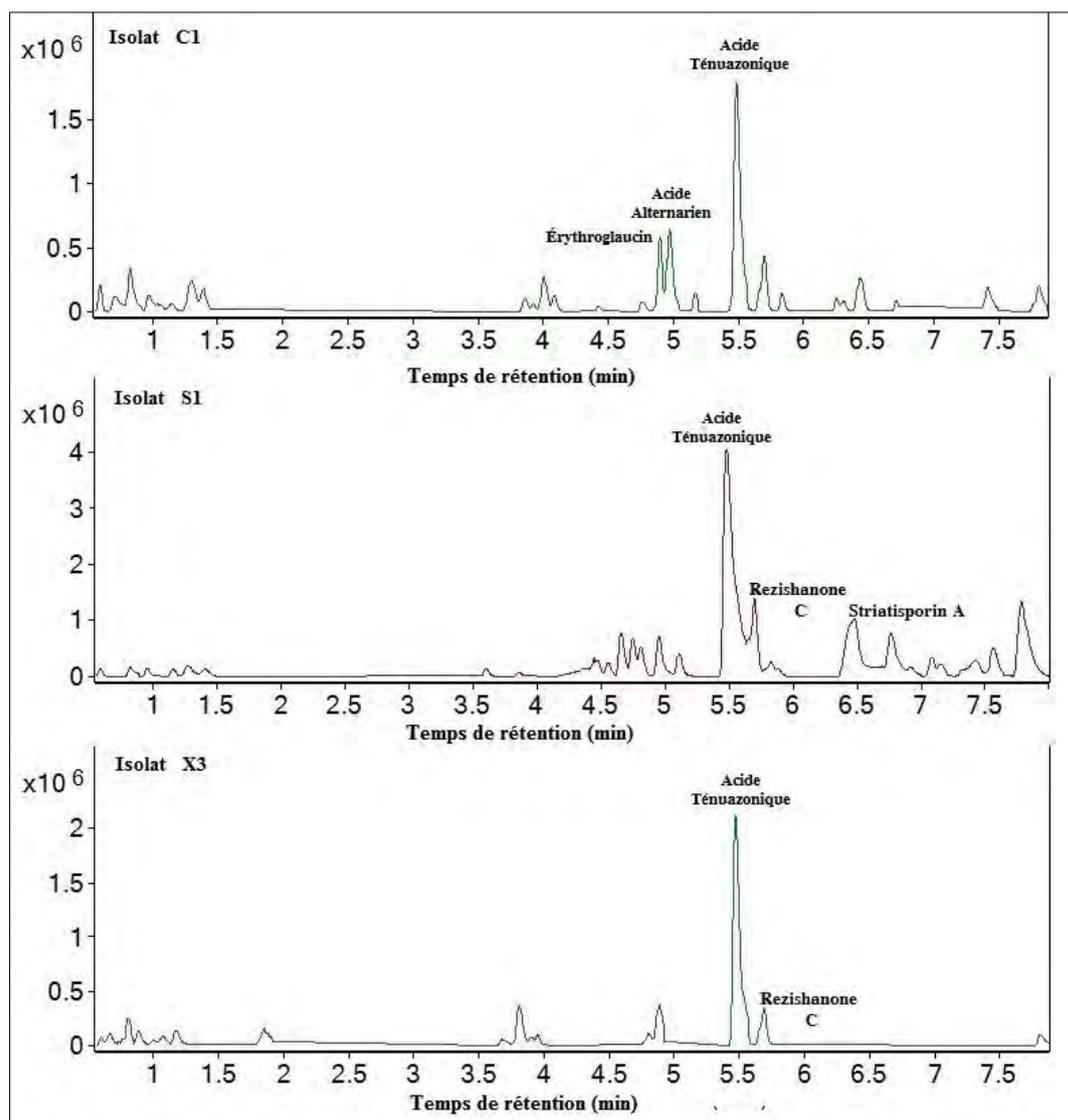


Figure 16. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des filtrats de culture des trois isolats d'*A. alternata* X3, S1 et C1.

1.1.2. Composition biochimique des fractions récupérées à partir des extraits bruts des filtrats de cultures des trois isolats d'*Alternaria alternata*

- **Isolat C1** : L'analyse des fractions obtenues à partir de l'extrait brut de filtrat de culture de l'isolat C1 de *A. alternata* a montré que le *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 (SMTP-7) (TR = 4,78 min) se trouve en quantité moyenne dans les fractions b₁, c₁, d₁, e₁, f₁, g₁, i₁, j₁ et en quantité élevée dans la fraction h₁. Les fractions contiennent également de l'acide ténuazonique (TeA) (TR= 5,5 min), (6 fractions sur 10 : b₁, f₁, g₁, h₁, i₁, j₁ avec de faibles quantités). Cinq fractions (b₁, c₁, e₁, f₁, g₁) contiennent de la Décaestricine N en faible quantité et seule la fraction g₁ contient des tricycloalternarènes (ACTG) toxine A (TR= 6,6 min) en faible quantité (**Figure 17**).

- **Isolat S1** : En ce qui concerne l'isolat S1 d'*A. alternata*, 2 des 7 fractions de l'extrait brut contiennent de la SMTP-7 en quantité modérée et de l'acide ténuazonique en quantité moyenne. La fraction b est la seule à contenir du Virescénoside M et de la Phénistatine (TR= 4,54 et 4,59 min, respectivement) en grande quantité, elle contient également la toxine A de l'ACTG (TR= 6,60) en faible quantité (**Figure 18**).

-**Isolat X3** : Quant à la composition de l'extrait brut de l'isolat X3 d'*A. alternata*, les 8 fractions contiennent de la SMTP-7 (TR= 4,78 min) en quantité modérée, 6 d'entre-elles (sauf les fractions b et d) contiennent de la Décarestricine N (TR= 0,69 min) en faible quantité, la fraction d contient une faible quantité de Botrydial. Cinq des 8 fractions contiennent de l'acide ténuazonique (sauf les fractions c, d et e), les quantités d'acide ténuazonique dans ces fractions varient de moyennes à faibles. L'acide benzoïque (TR= 6,16 min) est présent dans les fractions a et b avec de faibles quantités. Le cyclo-(L-Phe-L-Pro) est présent exclusivement dans la fraction b de l'isolat X3 et en grande quantité (TR= 4,60 min) (**Tableau 18**). Par ailleurs, plusieurs fractions contiennent des composants en quantités très élevées mais qui n'ont pas pu être identifiées (**Figure 19**).

Tableau 18. Composants des fractions d'*Alternaria alternata* isolats C1, S1 et X3

Composants	Fraction a			Fraction b			Fraction c			Fraction d			Fraction e			Fraction f			Fraction g			Fraction h			Fraction i			Fraction j		
	C1	S1	X3																											
Decarestrictin N			+	+			+		+				+	+	+	+	+	+	+	+			+	+						
Cyclo-(L-Phe-L-Pro)			+																											
SMTP-7		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+			
Acide tenuazonique			+	+	+	+		+			+			+		+	+	+	+	+	+	+	+				+			
2-(4-Hydroxyazobenzene) Acide benzoïque			+	+		+																								
(+)-Phomopsidin				+						+			+						+											
Virescenoside M					+																									
Phoenistatin					+																									
ACTG toxin A					+														+											
Wortmannilactones (F-H)												+																		
Fumagillin methyl ester												+																		
Acide viridominique C												+																		
Botrydial													+																	
Acide Ganoderique B																														
Acide viridominique B																														
Acide picolinique																														

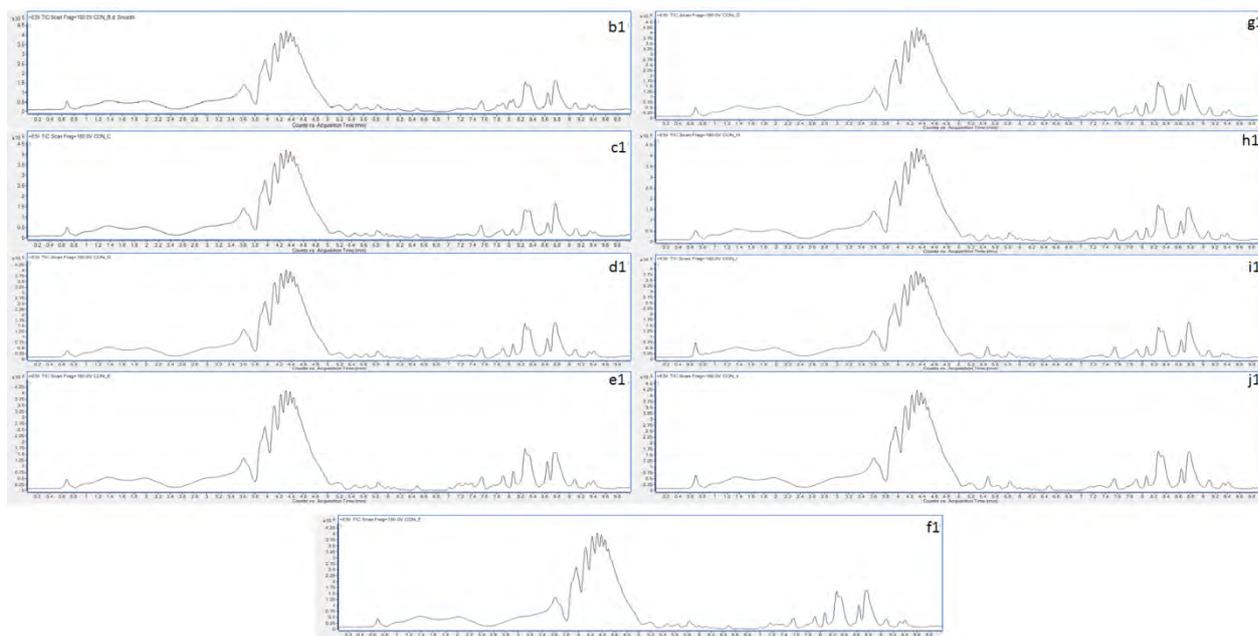


Figure 17. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des neuf fractions issues de l'extrait brut d'*Alternaria alternata* isolat C1.

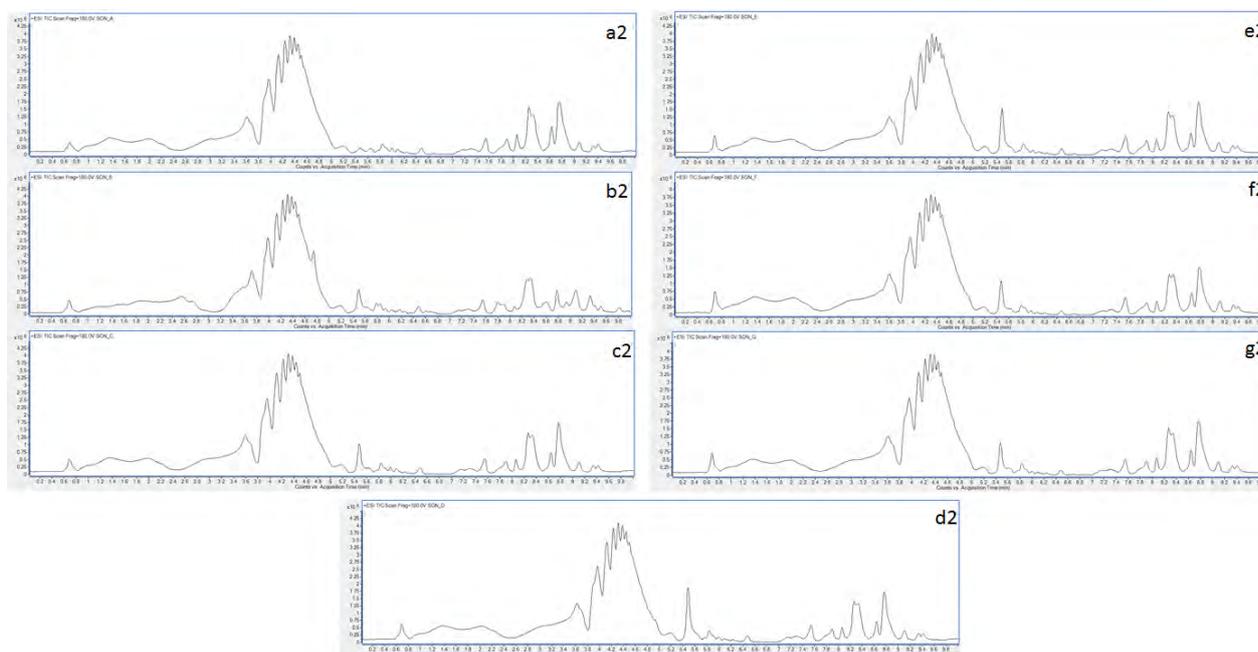


Figure 18. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des sept fractions issues de l'extrait brut d'*Alternaria alternata* isolat S1.

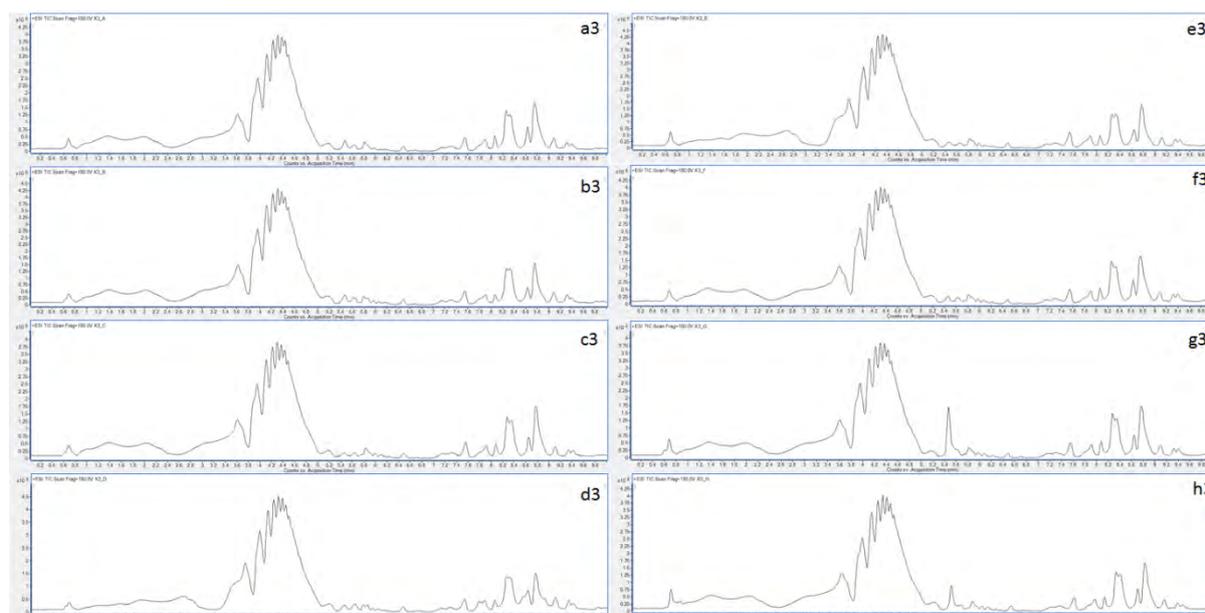


Figure 19. Chromatogrammes présentant la quantité d'ions détectés en fonction du temps de rétention des huit fractions issues de l'extrait brut d'*Alternaria alternata* isolat X3.

2. Effet des extraits bruts d'*Alternaria alternata* isolats X3, S1 et C1 et de leurs fractions sur les feuilles détachées des trois adventices cibles.

- Effet sur les feuilles détachées de *C. arvensis* :

L'extrait brut et seules les fractions d₁, e₁, h₁ et i₁ ont pu causer des symptômes mais uniquement sur les feuilles blessées. L'analyse de la variance a montré un effet très significatif de l'extrait brut et des fractions d₁, e₁, i₁ sur la sévérité des symptômes sur les feuilles blessées ($P \leq 0.001$). La phytotoxicité la plus élevée a été enregistrée sur les feuilles traitées avec les fractions d₁, e₁ et i₁ (**Figure 20**). L'extrait brut et les fractions d₁, e₁ ont causé de petites nécroses entourées de chloroses, les deux fractions ont causé la destruction totale des feuilles à la fin de l'essai, c'est-à-dire au 4^{ème} jour. La fraction h₁ a causé des nécroses plus importantes que les deux autres (d₁, e₁) mais n'a pas entraîné la destruction totale des feuilles, la fraction i₁ a causé des taches noires qui ont ensuite envahi toute la surface de la feuille. Les deux témoins n'ont développés aucun symptôme (**Figure 21**).

- Effet sur les feuilles détachées de *S. oleraceus* :

Seules les fractions a₂ et f₂ de l'isolat S₁ ont causé des symptômes uniquement sur les feuilles blessées. L'analyse de la variance a montré un effet significatif de la fraction a₂ sur la sévérité des symptômes sur les feuilles détachées blessées ($P = 0,002$). Les deux fractions n'ont pas montré un effet phytotoxique élevé (**Figure 22**). Les symptômes causés par les deux fractions se présentaient sous la forme de zones brunes (**Figure 23**). L'extrait brut n'a causé aucun symptôme.

- Effet sur les feuilles détachées de *X. strumarium* :

L'extrait brut et ses huit fractions n'ont montré aucun effet sur les feuilles détachées, qu'elles soient blessées ou non.

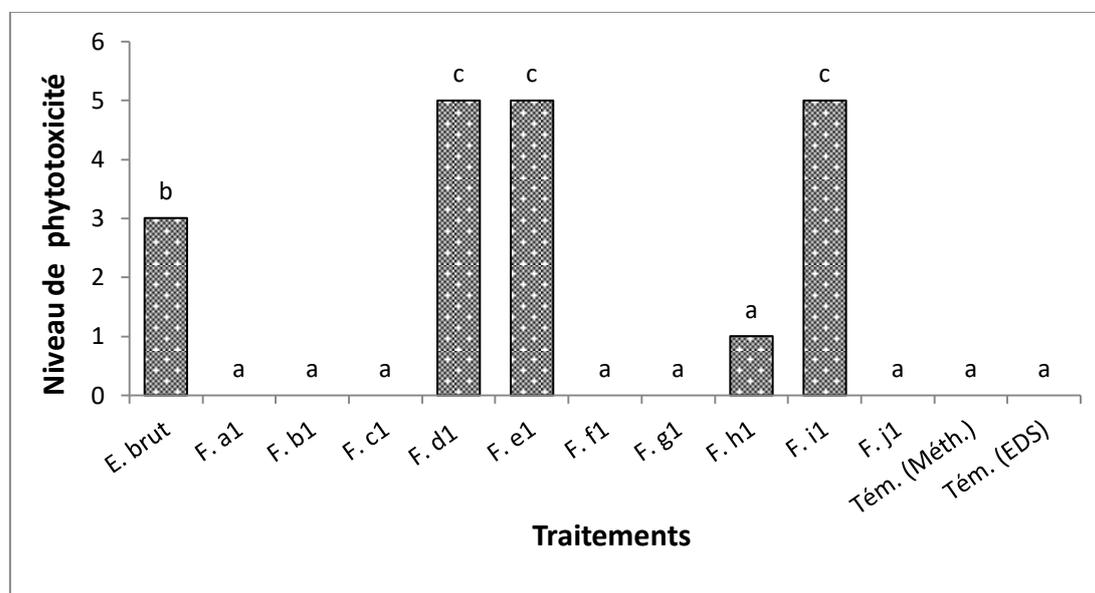


Figure 20. Effet de l'extrait brut et des fractions du filtrat de culture de l'isolat C1 sur les feuilles détachées de *Convolvulus arvensis*. E : Extrait, F. : Fraction, Tém.: Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth : Méthanol.

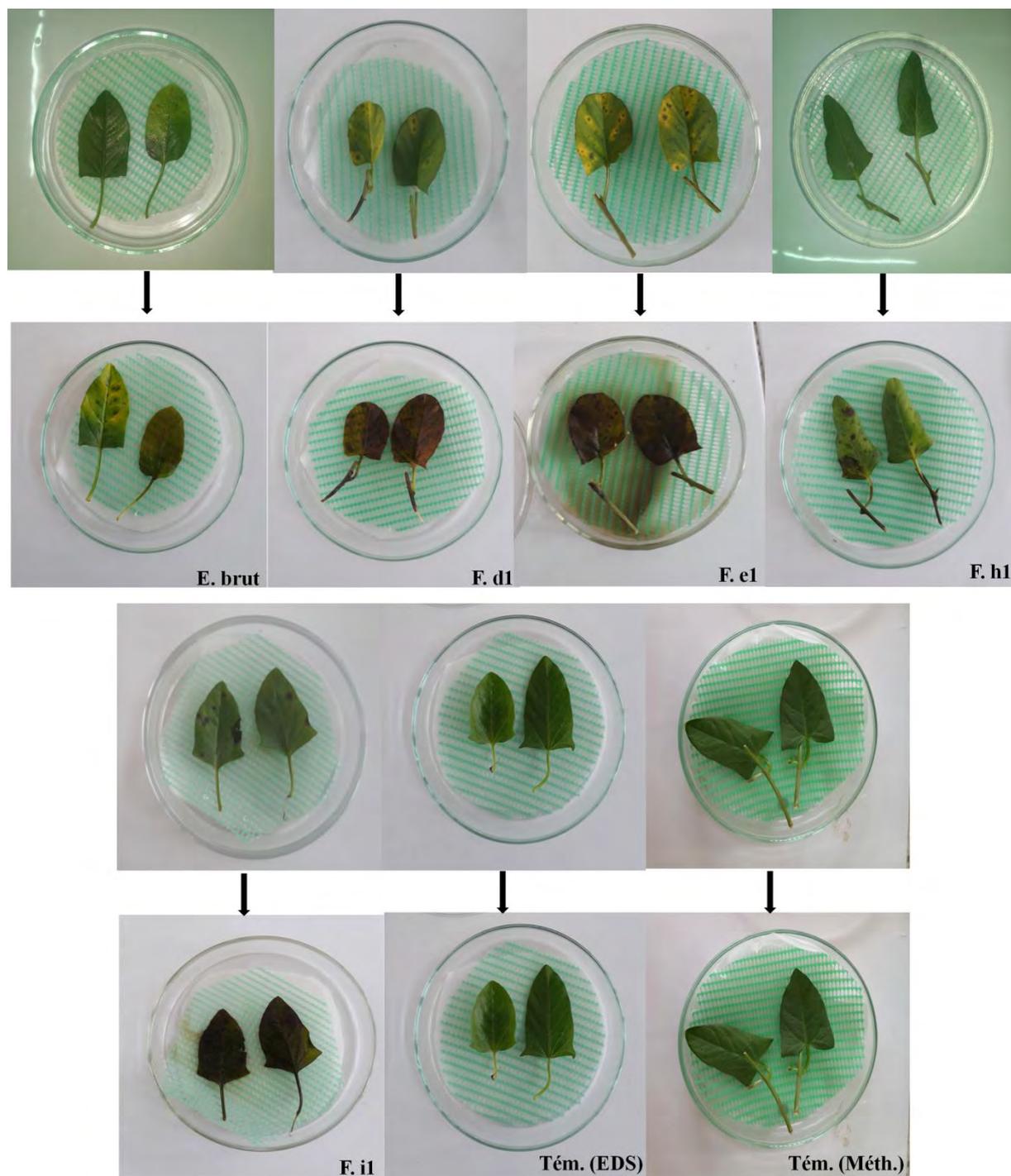


Figure 21. Aspect des feuilles détachées de *Convulvulus arvensis* après le traitement par l'extrait brut et les fractions du filtrat de culture de l'isolat C1 : d₁, e₁, h₁ et i₁. E : Extrait, Frac : Fraction, Tém.: Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth. : Méthanol. La première rangée de photos représente les symptômes après un jour de traitement, la seconde représente les symptômes à la fin du test (4 jours après le traitement).

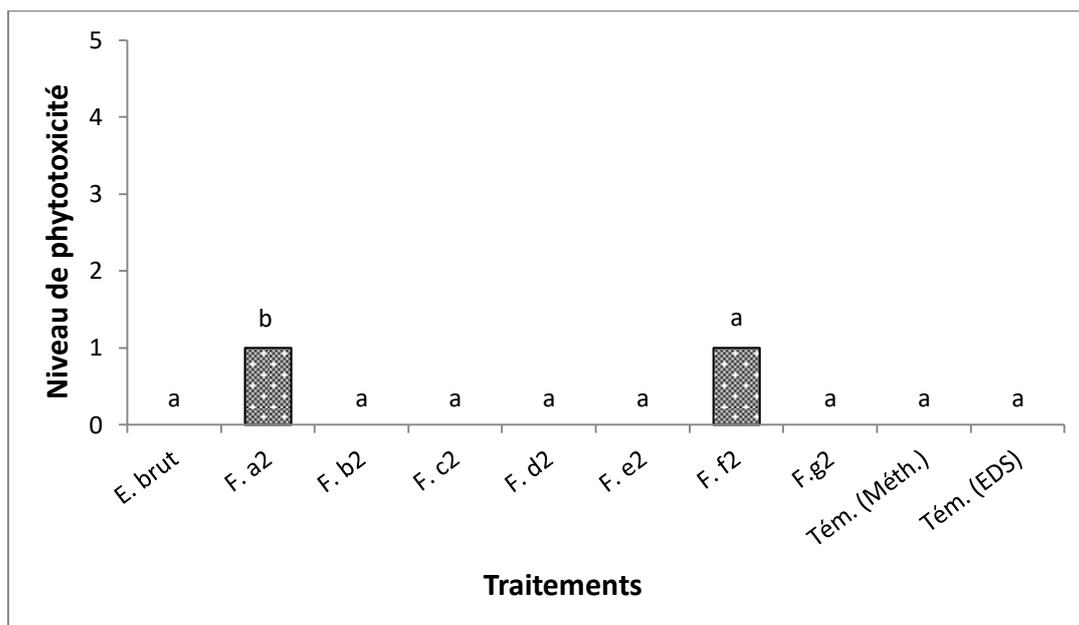


Figure 22. Effet de l'extrait brut et des fractions du filtrat de culture de l'isolat S1 sur les feuilles détachées de *Sonchus oleraceus*. E : Extrait, F. : Fraction, Tém.: Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth : Méthanol.

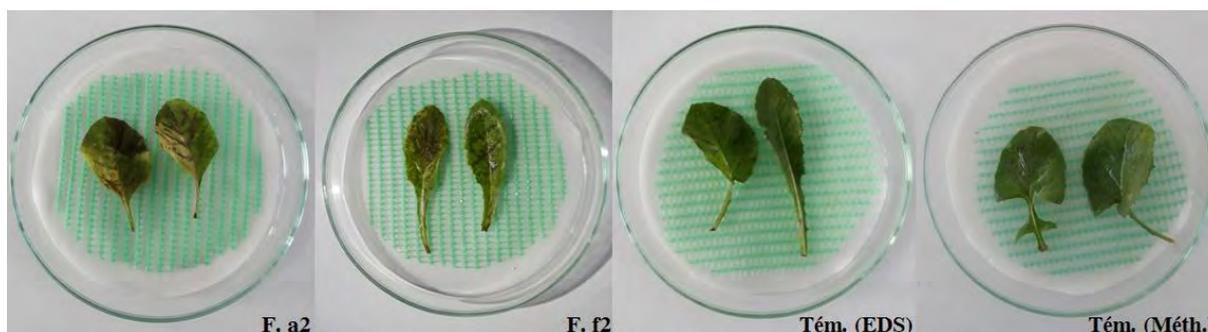


Figure 23. Aspect des feuilles détachées de *Sonchus oleraceus* après le traitement par l'extrait brut et les fractions a₂ et f₂. E : Extrait, F. : Fraction, Tém. : Témoin, EDS : Eau Distillé Stérile, Méth : Méthanol.

IV. Discussion

Le profil biochimique des trois filtrats de culture des trois isolats d'*A. alternata* a montré une composition différente, cependant avec certains composés en commun. Ainsi, l'acide ténazonique et le SMT-7 sont présents dans presque toutes les fractions des trois extraits bruts. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sottor et al. (2019), qui ont constaté que les souches de *Streptomyces* étroitement apparentées par le marqueur génétique de l'ARNr 16S produisaient un ensemble commun de substances chimiques et un autre ensemble unique pour chaque souche, ils ont considéré les métabolites secondaires communs comme

des métabolites secondaires principaux et les métabolites spécifiques pour chaque souche comme des métabolites secondaires accessoires. Uka et al. (2019) ont également constaté que *Aspergillus flavus* présente une grande diversité intra-spécifique de métabolites secondaires. Cette différence biochimique des souches peut s'expliquer par le transfert horizontal de gènes (HGT) des voies de biosynthèse entières (Khaldi et al., 2008 ; Ziemert et al., 2014). Cette différence peut également s'expliquer par la concurrence environnementale, les besoins de survie de la souche, la nécessité de s'adapter et de se spécialiser dans leur niche écologique particulière et les différences d'hôtes (Sottor et al., 2019 ; Uka et al., 2019).

Dans notre étude, l'acide ténuazonique s'est avéré être le principal composé des trois filtrats de cultures, il est présent dans la plupart des fractions mais en quantités différentes. Cette constatation est en accord avec les résultats de Meronuck et al. (1972) et Davis et al., (1977) qui ont également constaté que l'acide ténuazonique était le principal composé des isolats d'*A. alternata* étudiés et également en différentes quantités. L'acide ténuazonique a été isolé pour la première fois à partir d'*Alternaria tenuis* par Rosett et al. (1957). Il a été détecté dans les filtrats de culture de plusieurs champignons, en particulier, ceux du genre *Alternaria* (*Pyricularia oryzae*, *phoma sorghina*, *Alternaria longiceps*, *A. kikuchiana*, *A. mali*, *A. alternata* et *A. tenuissima*) (Devi et al., 2010 ; Alexander et al., 2011). De surcroît, l'acide ténuazonique est connu pour son potentiel comme herbicide naturel (Davis et al., 1977 ; Sanodiya et al., 2009 ; 2010).

Le deuxième composé important détecté était le SMTP-7 (*Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7) qui est un composant de faible poids moléculaire qui a un effet thrombolytique, anti-inflammatoire et des activités antioxydantes, il est généralement sécrété par l'espèce fongique *Stachybotrys microspora*, il a également une excellente activité thérapeutique contre l'infarctus cérébral de plusieurs espèces de rongeurs (Hashimoto et al., 2010 ; Shibata et al., 2010 ; Sawada et al., 2014).

Certaines fractions, à savoir d_1 , e_1 , h_1 , i_1 , a_2 et f_2 , ont provoqué des symptômes (nécrose et chlorose) sur des feuilles détachées blessées de *S. oleraceus* et *C. arvensis*. Les quatre fractions (d_1 , e_1 , h_1 et i_1) qui ont donné un effet sur les feuilles détachées blessées de *C. arvensis* contiennent toutes de la SMTP-7 en quantités moyennes et de l'acide ténuazonique ou de la (+)-Phomopsidine en petites quantités, ainsi que d'autres composants non identifiés, ces composants sont également présents dans deux autres fractions (g_1 et j_1) qui n'ont pas donné d'effet. Les deux fractions (a_2 et f_2) qui ont montré un effet sur les feuilles détachées blessées de *S. oleraceus* contiennent du SMTP-7, la fraction f_2 contient de l'acide

ténuazonique, de l'acide benzoïque et de la décarestricine N, ces deux fractions contiennent également des composants non identifiés. Les composants identifiés sont également présents dans d'autres fractions qui n'ont pas donné d'effet. Ce résultat peut s'expliquer par la différence entre les composants non identifiés. Cet effet est confirmé par les résultats de plusieurs études qui ont montré l'efficacité des métabolites secondaires d'*Alternaria* contre les adventices (*Xanthium occidentale*, *Parthenium hysterophorus* et *Lantana camara*) (Vurro et al., 1998 ; Sanodiya et al., 2009 ; Sanodiya et al., 2010). Ces effets peuvent être dus à la présence de substances phytotoxiques à potentiel herbicide (Evidente et al., 1998 ; Evidente et al., 2011 ; Cimmino et al., 2013).

De façon inattendue, l'extrait brut et ses fractions issus du filtrat de culture de l'isolat X3 n'ont montré aucun effet sur les feuilles détachées (blessées ou non) de *X. strumarium*, ce résultat peut être dû à la faible dose utilisée dans ce test. La dose utilisée était la même pour tous les extraits bruts et leurs fractions des trois isolats d'*A. alternata*, le pouvoir toxicogène des espèces d'*Alternaria* et l'effet de chaque composant toxique varient d'un isolat à un autre (Meena et al., 2016 ; 2017 b). Zhou et al. (2019), ont constaté que l'effet des métabolites secondaires d'*Alternaria alternata* sur les plantes augmente avec la concentration de ces métabolites et que cet effet diffère selon les espèces.

Les métabolites secondaires ne peuvent pas pénétrer la feuille, c'est pourquoi Evidente et al. (1998) et Vurro et al. (1998) ont recommandé la combinaison des métabolites secondaires avec l'agent pathogène lui-même (l'agent pathogène pourrait être aidé par la toxine, pendant la phase de pénétration et de colonisation, pour augmenter le niveau d'attaque sur l'adventice, sans aucun effet sur la plante non hôte), ainsi qu'avec d'autres méthodes de lutte dans la gestion intégrée des adventices.

L'utilisation de certains champignons à pouvoir phytopathogène à l'égard des adventices constitue une approche de biocontrôle prometteuse pour la régulation et la maîtrise de la densité croissante des adventices en milieu agricole.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit l'objectif de notre travail visant la recherche des champignons à potentiel mycoherbicide. Ceci a impliqué également leur identification morphologique et par outils moléculaires, leur formulation et l'évaluation de leur pouvoir mycoherbicide à l'égard de leurs adventices cibles.

Des prospections ont été faites au niveau de la station expérimentale et la ferme centrale de l'ENSA, ainsi qu'au niveau de la station expérimentale de l'ITGC de Oued Semar afin de détecter les maladies dominantes sévissant sur trois des adventices des plus redoutables en Algérie, à savoir *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus* et *Convolvulus arvensis*.

Plusieurs symptômes de maladies ont été observés sur ces adventices, cependant les maladies des taches foliaires (leaf spot) étaient les plus dominantes avec une incidence approximative de 70 % et une sévérité d'attaque allant de 50 à 70 %.

Des feuilles des trois adventices collectées qui présentaient des symptômes de taches nécrotiques ont été utilisées pour l'isolement. Au total, 15 isolats ont été obtenus mais seulement les trois les plus agressifs ont été retenus (l'isolat 1 codé "X3", l'isolat 2 codé "S1" et l'isolat 3 codé "C1" isolés respectivement, des feuilles de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*).

L'identification moléculaire de ces trois isolats a montré qu'ils appartiennent tous à *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. puisqu'ils présentent une analogie de 99 % avec la souche type CBS 916.96 de ce champignon déposée dans la banque de gènes NCBI. Il est à préciser que l'identification morphologique de l'isolat X3 répondait parfaitement à la description d'*Alternaria tenuissima* que la classification actuelle rattache à *A. alternata*.

D'après les résultats d'identification obtenus et les recherches bibliographiques y compris dans les bases de données sur les champignons infectant *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*, il s'agit d'un premier signalement d'*A. alternata* infectant naturellement *X. Strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis* en Algérie.

L'évaluation du potentiel mycoherbicide des trois isolats a été conduite *in-vitro*, *in-vivo* et *in-situ* par l'utilisation de leurs suspensions de spores et de leurs formulations liquides, à base de l'huile de colza, et solides, à base d'Alginate de Sodium. La formulation liquide s'est révélée la plus efficace parmi les traitements fongiques testés. Son efficacité, néanmoins, ne dépassait pas celle de l'herbicide Mustang® même utilisé à 75 % de la dose recommandée.

Par ailleurs, et dans l'ensemble, nous avons obtenu un contrôle partiel des deux adventices, *X. strumarium* et *S. oleraceus*, puisque le traitement avec la formulation à base d'huile de colza d'*A. alternata* isolats X3 et S1 a réduit à environ de moitié la biomasse sèche de *X. strumarium* et *S. oleraceus in-vivo* et *in-situ* comparativement au témoin sain (non traité). Ce potentiel mycoherbicide peut toutefois être accru par l'utilisation d'inoculum et de formulations plus efficaces ou par la combinaison de plusieurs agents pathogènes ou bien encore la combinaison avec d'autres méthodes de lutte.

La composition biochimique des filtrats de cultures des trois isolats d'*A. alternata* et des fractions de leurs extraits bruts a montré une grande hétérogénéité biochimique entre les trois isolats avec la présence remarquable de l'acide ténazonique et *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 (SMTP-7). D'après les recherches bibliographiques, il s'avère que très probablement notre étude est la première à avoir trouvé que le *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 est produit par *Alternaria alternata*.

Cette hétérogénéité biochimique se traduit par la différence dans le nombre de fractions issues et par la présence de certains composés ne se trouvant que dans un filtrat de culture d'un isolat donné. Ainsi, Chaetoquadrin E et l'Acide Tanzawaic F ne se trouvent que dans le filtrat de culture de l'isolat C1 associé à *C. arvensis*; tandis que la Cytosporine C et la Striatosporine A ne se trouvent que dans le filtrat de culture de l'isolat S1 associé à *S. oleraceus*. De même, le Cyclo-(Pro-Ala) n'est présent que dans le filtrat de culture de l'isolat X3 associé à *X. strumarium*.

Testés sur les feuilles détachées des deux adventices, *C. arvensis* et *S. oleraceus*, les extraits bruts et certaines fractions issus des filtrats de cultures des deux isolats (C1 et S1) ont induit des symptômes (nécroses et chloroses) dont la sévérité pouvait aller jusqu'à la destruction totale des feuilles.

En conclusion, il serait intéressant, d'élargir le spectre des recherches pour mettre en évidence :

- L'interaction *A. alternata*-hôte (*X. Strumarium*, *S.oleraceus* et *C. arvensis*)
- Les hôtes possibles pour ces souches (plantes cultivés et non cultivés)
- Toute la composition biochimique active de ces champignons et leurs effets sur certains fléaux.
- La combinaison de ces souches avec des doses réduites d'herbicide ou avec d'autre méthode de lutte.

Résumé

Des prospections ont été faites au niveau de la station expérimentale et la ferme centrale de l'ENSA, ainsi qu'au niveau de la station expérimentale de l'ITGC de Oued Semar à Alger afin de détecter les maladies dominantes sévissant sur trois des adventices des plus redoutables en Algérie, à savoir *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus*, *Convolvulus arvensis*. Plusieurs symptômes de maladies ont été observés sur des feuilles attaquées des trois adventices, à savoir des taches nécrotiques, du feutrage blanc sur la face supérieure et des pustules blanches et rouges. Néanmoins, le symptôme le plus dominant est celui des taches nécrotiques, avec une incidence approximative de 70 % et une sévérité d'attaque allant de 50 à 70 %. Notre choix s'est porté sur le symptôme des taches nécrotiques en raison de sa prédominance. Au total, 15 isolats ont été obtenus et soumis à des tests de pathogénicité sur les feuilles détachées des trois adventices. Les trois isolats les plus agressifs ont été retenus (l'isolat 1 codé "X3", l'isolat 2 codé "S1" et l'isolat 3 codé "C1" isolés respectivement des feuilles de *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*). L'identification des trois isolats s'est basée sur les caractères morphologiques et les caractères moléculaires (ITS, rpb2 et gapdh). Les résultats obtenus ont montré que les trois isolats appartiennent tous à *Alternaria alternata* puisqu'ils présentent une analogie de 99 % avec la souche type CBS 916.96 de ce champignon déposée dans la banque de gènes NCBI. Il est à préciser que l'identification morphologique de l'isolat X3 répondait parfaitement à la description d'*A. tenuissima* que la classification actuelle rattache à *A. alternata*. D'après les résultats d'identification obtenus et les recherches bibliographiques y compris dans les bases de données sur les champignons infectant *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis*, il s'agit d'un premier signalement d'*A. alternata* infectant naturellement *X. strumarium*, *S. oleraceus* et *C. arvensis* en Algérie. L'évaluation du potentiel mycoherbicide des trois isolats a été conduite *in-vitro*, *in-vivo* et *in-situ* par l'utilisation de leurs suspensions de spores et de leurs formulations liquides, à base de l'huile de colza, et solides, à base d'Alginate de Sodium. La formulation liquide s'est révélée la plus efficace parmi les traitements fongiques testés (des sévérités de maladie de 98,4-99,5 %, 80-98 % et 43-63 % respectivement ont été montrés sur les feuilles détachées des trois adventices et les feuilles des plantules de *X. strumarium* et *S. oleraceus in-vivo* et *in situ*). Son efficacité, néanmoins, ne dépassait pas celle de l'herbicide Mustang® même utilisé à 75 % de la dose recommandée. Par ailleurs, et dans l'ensemble, nous avons obtenu un contrôle partiel des deux adventices ; *X. strumarium* et *S. oleraceus*. La composition biochimique des filtrats de cultures des trois isolats d'*A. alternata* et des fractions de leurs extraits bruts a montré une grande hétérogénéité biochimique entre les trois isolats avec la présence remarquable de l'acide ténuazonique et *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 (SMTP-7). D'après les recherches bibliographiques, il s'avère que très probablement notre étude est la première à avoir trouvé que le *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 est produit par *A. alternata*. Cette hétérogénéité biochimique se traduit par la différence dans le nombre de fractions issues et par la présence de certains composés ne se trouvant que dans un filtrat de culture d'un isolat donné. L'essai sur les feuilles détachées des deux adventices ; *C. arvensis* et *S. oleraceus* avec les extraits bruts et certaines fractions issus des filtrats de cultures des deux isolats (C1 et S1) ont induit des symptômes (nécroses et chloroses) dont la sévérité pouvait aller jusqu'à la destruction totale des feuilles (100 %).

Mots clés : *Alternaria alternata*, *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus*, *Convolvulus arvensis* et mycoherbicide.

Abstract

Surveys were carried out at the ENSA experimental station and central farm, as well as at the ITGC experimental station of Oued Semar in Algiers in order to detect the dominant diseases affecting three of the most formidable weeds in Algeria, namely *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus*, *Convolvulus arvensis*. Several disease symptoms were observed on attacked leaves of the three weeds, namely necrotic spots, white felting on the upper surface and white and red pustules. Nevertheless, the most dominant symptom was necrotic spots, with an approximate incidence of 70 % and a severity of attack ranging from 50 to 70 %. We chose the necrotic spot symptom because of its predominance. A total of 15 isolates were obtained and tested for pathogenicity on the detached leaves of the three weeds. The three most aggressive isolates were selected (isolate 1 coded "X3", isolate 2 coded "S1" and isolate 3 coded "C1" isolated respectively from the leaves of *X. strumarium*, *S. oleraceus* and *C. arvensis*). The identification of the three isolates was based on morphological and molecular characters (ITS, rpb2 and gapdh). The results obtained showed that all three isolates belonged to *Alternaria alternata* since they presented a 99% analogy with the type strain CBS 916.96 of this fungus deposited in the NCBI gene bank. It should be noted that the morphological identification of isolate X3 perfectly matched the description of *A. tenuissima* that the current classification assigns to *A. alternata*. According to the identification results obtained and the bibliographical research including databases on fungi infecting *X. strumarium*, *S. oleraceus* and *C. arvensis*, this is a first report of *A. alternata* naturally infecting *X. strumarium*, *S. oleraceus* and *C. arvensis* in Algeria. The evaluation of the mycoherbicidal potential of the three isolates was conducted *in-vitro*, *in-vivo* and *in-situ* using their spore suspensions and their liquid formulations, based on rapeseed oil, and solid formulations, based on Sodium Alginate. The liquid formulation proved to be the most effective among the fungal treatments tested (disease severities of 98.4-99.5%, 80-98% and 43-63% respectively were shown on the detached leaves of the three weeds and the leaves of *X. strumarium* and *S. oleraceus* seedlings *in-vivo* and *in-situ*). Its efficacy, however, did not exceed that of Mustang® herbicide even when used at 75% of the recommended rate. On the other hand, and overall, we obtained partial control of both weeds; *X. strumarium* and *S. oleraceus*. The biochemical composition of the culture filtrates of the three isolates of *A. alternata* and the fractions of their crude extracts showed great biochemical heterogeneity among the three isolates with the remarkable presence of tenuazonic acid and *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 (SMTP-7). Based on the literature search, it appears that our study is most probably the first to have found that *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 is produced by *A. alternata*. This biochemical heterogeneity is reflected in the difference in the number of fractions produced and in the presence of certain compounds that are only found in a culture filtrate of a given isolate. The test on the detached leaves of the two weeds ; *C. arvensis* and *S. oleraceus* with the crude extracts and certain fractions from the culture filtrates of the two isolates (C1 and S1) induced symptoms (necrosis and chlorosis) whose severity could go up to total destruction of the leaves (100%).

Mots clés : *Alternaria alternata*, *Xanthium strumarium*, *Sonchus oleraceus*, *Convolvulus arvensis* et mycoherbicide.

ملخص

ينقسم العمل المُعد في إطار أطروحة الدكتوراه هذه إلى مقدمة عامة وأربعة فصول: يتعلق الفصل الأول بالبيانات الحديثة عن الأعشاب الضارة الثلاثة المدروسة (*Xanthium strumarium* L. و *Sonchus oleraceus* L. و *Convolvulus arvensis* L.) والفطر *Alternaria alternata* (Fries.) Kiessler. يتضمن الفصل الثاني التعريف المورفولوجي والجزئي للعزلات الثلاثة من *A. alternata*. يتعلق الفصل الثالث بتقييم قوة تأثير مبيدات الأعشاب لمحلول الأبواغ للعزلات الفطرية الثلاثة لـ *A. alternata* وتركيباتها وكذلك تأثير مبيدات الأعشاب Mustang® بتركيز مخفض على الأنواع الأربعة للأعشاب الضارة. يتناول الفصل الرابع والأخير تقييم قدرة المبيدات للمستخلصات الخام وأجزاء العزلات الفطرية الثلاثة فيما يتعلق بـ *X. strumarium* و *S. oleraceus* و *C. arvensis*. أخيراً، يلخص الاستنتاج العام جوهر النتائج ويعرض وجهات النظر لمزيد من الأبحاث. تم إجراء عمليات مسح في المحطة التجريبية والمزرعة المركزية لـ ENSA، وكذلك على مستوى المحطة التجريبية ITGC في واد السمار بالجزائر العاصمة من أجل الكشف عن الأمراض السائدة المنتشرة على ثلاثة أنواع من الأعشاب الضارة الأكثر شيوعاً في الجزائر، وهي *X. strumarium* و *S. oleraceus* و *C. arvensis*. وقد لوحظت العديد من الأعراض المرضية على الأوراق التالفة للأعشاب الثلاثة، وهي بقع نخريه، غبار أبيض على السطح العلوي، وبثور بيضاء وحمراء. ومع ذلك، فإن أكثر الأعراض انتشاراً هو البقع النخرية، حيث تبلغ نسبة حدوثها تقريباً 70٪ وتتراوح شدة الإصابة من 50 إلى 70٪. وقع اختيارنا على أعراض البقع النخرية بسبب غلبتها. تم الحصول على 15 عزلة واختبار قابليتها لتسبب لأمراض على الأوراق المنفصلة للأعشاب الضارة الثلاثة. تم اختيار العزلات الثلاثة الأكثر شدة (عزل 1 مشفر "X3"، عزل 2 مشفر "S1" وعزل 3 مشفر "C1" معزول على التوالي من أوراق *X. strumarium*، *S. oleraceus* و *C. arvensis*). استند التعرف على العزلات الثلاثة إلى الصفات المورفولوجية والجزئية (ITS، *gapdh*، *rpb2*). أظهرت النتائج المتحصل عليها أن العزلات الثلاثة تنتمي جميعها إلى *A. alternata* حيث أن لها تشابه 99٪ مع سلالة النوع CBS 916.96 من هذا الفطر المسجل في بنك الجينات NCBI. تجدر الإشارة إلى أن التعريف المورفولوجي لعزل X3 يتوافق تماماً مع وصف *A. tenuissima* بينما التصنيف الحالي يتعلق بـ *A. alternata*. بناءً على نتائج التعريف التي تم الحصول عليها بالاستناد على البحث البيولوجي بما في ذلك قواعد البيانات عن الفطريات التي تصيب *X. strumarium* و *S. oleraceus* و *C. arvensis*، إن هذا هو التقرير الأول لـ *A. alternata* التي تصيب بشكل طبيعي *X. strumarium* و *S. oleraceus* و *C. arvensis* في الجزائر. تم إجراء تقييم قوة تأثير مبيد الفطريات للعزلات الثلاثة في المختبر (*in vitro*)، وداخل الجسم الحي (*in vivo*) وفي الموقع (*in situ*) باستخدام محلول الأبواغ وتركيباتها السائلة، المرتكز على زيت بذور السلجم، والمواد الصلبة، على أساس الجينات الصوديوم. وجد أن التركيبة السائلة هي الأكثر فاعلية بين التركيبات الفطرية المختبرة (شدة المرض 98.4-99.5٪، 80-98٪ و 43-63٪ على التوالي على الأوراق للأعشاب الضارة الثلاثة. وأوراق نباتات: *X. strumarium* و *S. oleraceus* في الجسم الحي (*in vivo*) وفي الموقع (*in situ*). ومع ذلك، لم تتجاوز فعاليته فعالية مبيد الأعشاب Mustang® حتى عند استخدامه بنسبة 75٪ من المعدل الموصى به. بالإضافة إلى ذلك، وعلى العموم، حصلنا على سيطرة جزئية على الأعشاب الضارة التالية: *X. strumarium* et *S. oleraceus*. أظهر التركيب الكيميائي الحيوي لمرشح المنتج للعزلات الثلاثة من *A. alternata* وأجزاء من مستخلصاتها الخام تبايناً كيميائياً حيوياً كبيراً بين العزلات الثلاثة مع وجود ملحوظ لحمض *tenuazonique* و *Stachybotrys microspora triprenyl phenol-7* (SMTP-7). استناداً إلى البحث البيولوجي، يبدو أن دراستنا على الأرجح هي الأولى التي وجدت أن *Stachybotrys microspora triprenyl phenol-7* تم إنتاجه بواسطة *A. alternata*. ينعكس عدم التجانس الكيميائي الحيوي هذا في الاختلاف في عدداً لاجزاء المنتجة وفي وجود مركبات معينة موجودة فقط في ترشيح منتج لعزلة معينة. الاختبار على الأوراق المنفصلة للعشبتين؛ *C. arvensis* و *S. oleraceus* مع المستخلصات الخام وأجزاء معينة تم الحصول عليها من ترشيح منتج للعزلتين (C1 و IS) يسببان الأعراض (النخر والاصفرار)، والتي يمكن أن تصل شدتها إلى التدمير الكامل لـ الأوراق (100٪).

الكلمات المفتاحية: *Convolvulus - Sonchus oleraceus L- Xanthium strumarium L - Alternaria alternata - arvensis L* – المبيد الفطري للأعشاب الضارة