



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et protection des végétaux

## Thème

Effet des métabolites secondaires de  
Trichoderma sp en lutte biologique

Présenté par : BELHADJ Hadjer  
BELABBASSI Houda  
HADDAD Selma

Devant le jury :

Président: BELKASMI F. MAA Université de Bachir El Ibrahimi BBA

Encadreur: MAAFI O. MAB Université de Bachir El Ibrahimi BBA

Examineur: MOUTASSIM D. MAA Université de Bachir El Ibrahimi BBA

Année universitaire : 2015/2016

## **Introduction**

Les maladies sont complexes et difficiles à combattre parce que souvent initiées par des blessures ce qui facilitent l'entrée et la progression des champignons. Cette situation conduit à une utilisation abusive de pesticides chimiques de synthèse, qui polluent inutilement, créent des conditions favorables au développement de la résistance des ennemis (insectes, bactéries, nématodes et champignons) à ces produits et détruisent les organismes utiles (Harman, 1992).

Plusieurs micro-organismes peuvent, avoir un effet bénéfique dans le contrôle des champignons pathogènes et ainsi minimiser l'effet délétère des pesticides (Adams, 1990).

La découverte de tels agents de lutte biologique et la démonstration de leur capacité à réduire l'incidence et la gravité des maladies ont tracé la voie à plusieurs recherches prometteuses (Alabouvette et al.,1993; Bélanger et Labbé, 1994; Boland, 1990; Lewis et Papavizas, 1987).

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et parfois parasites, des organismes eucaryotes, thallophytes (filaments mycéliens à croissance apical). Parmi les termes qui existe sur la liste taxonomique des moisissures , le terme *Trichoderma* qui a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon .Il désigne des champignons microscopiques filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. La forme parfaite appartient à la classe des Ascomycètes (*Hypocrea*). Ce genre comprend 20 espèces environ, cellulolytiques. Les *trichoderma* considérés durant 200 ans comme étant des Gastéromycètes. Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Harman, 1992).

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées. Et un agent antagoniste actif en lutte biologique sur divers agents pathogènes : le *Trichoderma* sp qui partagent la même niche écologique colonisent les racines vivantes des plantes.

Notre travail est consacré à l'étude de *Trichoderma* sp selon les points suivants :

La première partie est une synthèse bibliographique dans la quelle est abordée principalement des généralités sur *Trichoderma* sp.

la deuxième partie présente les matériels et les méthodes utilisées pour l'étude de l'activité antagoniste in vitro dans le but d'évaluer l'agressivité de nos souches de *Trichoderma* sur le FOC et étude in vivo dans le but d'évaluer le degré de protection des plantes des pois chiche par, *T.lutea crystallina*, *T.subeffusa* et *T. harasium* ,*T. neoforum*, *T.*

lutea et *T. koningii* après fermentation et extraction des métabolites secondaires bruts de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* par acétate d'éthyle pour évaluer l'activité antifongique de l'extrait in vitro. la troisième partie expose les résultats obtenus suivis des discussions.

# 1. Historique et taxonomie de *Trichoderma* sp

## 1.1. Historique

En 1794, Persoon décrit le premier *Trichoderma* sp. et définit 4 espèces.

En 1821, Fries classa les *Trichoderma* sp. parmi les Gastéromycètes.

En 1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredirait Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre.

En 1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques sous microscopie optique (surtout les phialides).

En 1916, Waksman décrit ce qu'il trouve être 6 nouvelles souches de *Trichoderma* sp. En utilisant des critères macroscopiques, différents de ceux préconisés par Harz.

En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères une fois de plus différents des précédents. Jusqu'à 1939 le raisonnement d'Abbot reste en vigueur, mais aussi à côté d'identifications totalement indépendantes.

En 1939, Bisby tente de mettre de l'ordre dans ces systèmes en proposant une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma*

En 1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédent, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales.

En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification « utilisable avec le concept « d'espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques. « Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer ». Neuf espèces agrégées sont créées (*T.aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai.,1969).

En comparaison avec les nombreux précédents, ce système semble le plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré récemment par Bissett (1984, 1991).

En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma* sp., sans rapport avec les espèces agrégées.

## 1.2. Taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett, 1998).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*.

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp. se présente comme suit (selon Bissett, 2004) :

**Embranchement** : Amastigomycota.

**Sous embranchement** : Ascomycotina

**Classe** : Sordariomycètes

**Ordre** : Hypocréales

**Famille** : Hypocraceae

**Genre** : *Trichoderma* .sp (Bissett, 2004)

## 1.3. Ecologie

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin. En effet, les *Trichoderma* sp. sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine.

Les *Trichoderma* sp terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes. Dans la mer, les *Trichoderma* sp. sont marins facultatifs. (Pivkin., 2000).

Le genre *Trichoderma* est l'un des 3 prédominants. Il vient à la 3ème position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma* sp. En milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau., 2001).

L'abondance des *Trichoderma* sp. Dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Mohamed-Benkada., 2006).

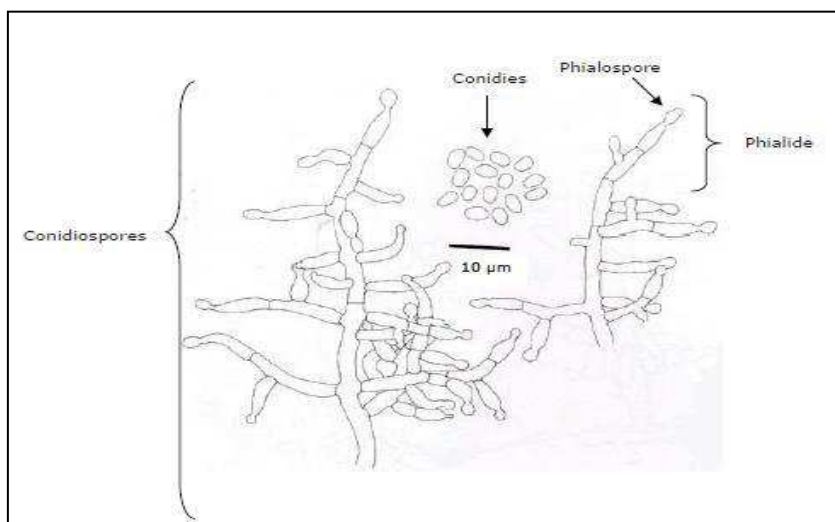
#### **1.4. Morphologie de *Trichoderma* sp**

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp. Est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse.

D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour un feutrage épais se superpose à la culture.

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Figure. 1) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek et al., 2003).



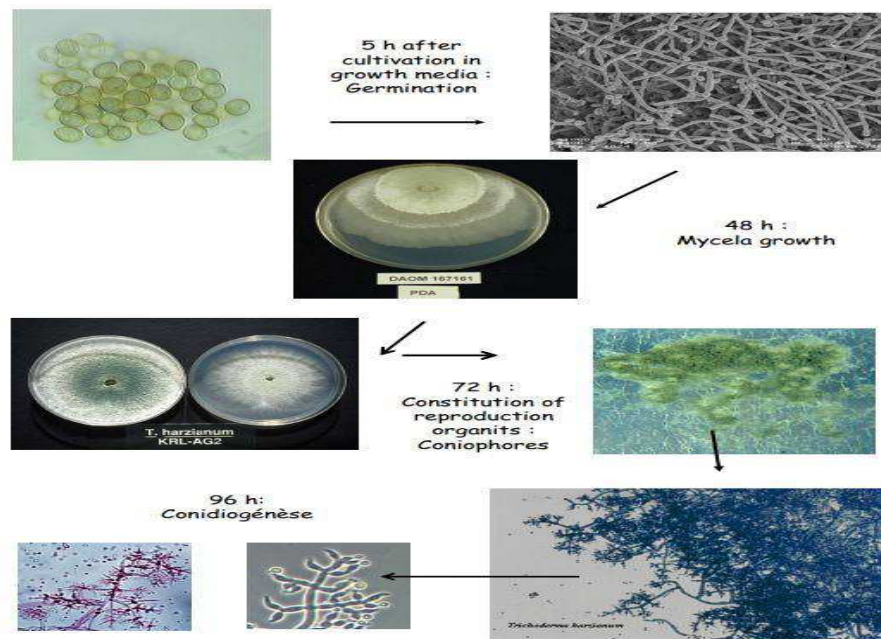
**Figure 1.** Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels et al., 1994).

## 1.5. Biologie *Trichoderma* sp

La température optimale de croissance est comprise entre 20°C et 28°C. Une bonne croissance est également observée pour 6°C et 32°C. Quelques cas exceptionnels de croissance ont été observés à 37°C, mais aucune à 0°C. Le point thermique de mortalité dans le sol est de 49°C à 55°C pendant 30 minutes. Le pH doit être compris entre 1,5 et 9, le pH optimum étant de 4,5-5,5. L'analyse de l'ADN montre que *T. viride* est constituée de 49,5-51% GC. Une longueur d'onde comprise entre 430 et 490 et/ou 320 et 380 nm favorise la sporulation. Les ions de cuivre permettent le développement des structures colorées. Une concentration élevée de sel dans le support inhibe la germination des conidies, mais pas la croissance du mycélium. Les conidies sont relativement résistantes aux rayonnements gamma (Subramanian., 1998).

## 1.6. Le cycle de *Trichoderma* sp

*Trichoderma* sp est un champignon asexué. Les conidiospores représentent la phase dominante de la multiplication (figure .2). Dans des conditions appropriées, les spores germent, donnent un mycélium, constitué de hyphes ramifiés, de nouvelles conidiospores sont formées dans des phialides. (Rifai., 2004).



**Figure 02.** Cycle biologique de *Trichoderma* sp (Rifai, 2004).

## 2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme, qu'ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses, qu'ils possèdent des voies de synthèse qui leurs sont propres à partir de produits du métabolisme primaire, que leur synthèse est dirigée par un ensemble de gènes auxquels sont souvent associés des gènes de régulation et de résistance, et qu'ils ne sont généralement produits que par un nombre limité d'organismes.

Les métabolites secondaires expriment l'individualité des espèces en terme chimique, d'autre part des espèces qui sont largement séparés peuvent produire la même classe des métabolites et par fois les mêmes métabolites secondaires. (Taylor et Francis, 1998)

Ce sont des molécules caractérisés par des structures chimiques très diversifiées, complexes, et inhabituelles. Ils sont souvent spécifiques aux organismes producteurs, parfois même à une seule espèce. (Miller, 2000).

### 2.1. Production de métabolites intéressants

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par *Trichoderma* sp. a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et al., 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990).

La littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma* sp sont principalement des enzymes et des molécules bioactives. Le travail de thèse de Landreau (2001) ayant présenté une synthèse bibliographique sur ces groupes de produits, nous ne les citons ici que très succinctement :

### 2.2. Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. Principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren et al., 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003).



## **7.2 Production de substances bioactives**

Métabolites volatils : 6 pentyl -pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes (Vizcaino et al., 2005).

Métabolites non volatils diffusibles : polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines (Blumenthal, 2004).

Métabolites polypeptidiques ; ciclosporines (immunosuppresseurs, antiinflammatoire) et les peptaïbols (Landreau, 2001).

## **2.3. Mode d'actions Trichoderma sp**

### **2.3.1. Compétition nutritive et spatiale**

Cette compétition est définie comme un phénomène général régissant la dynamique des populations des micro-organismes qui partagent la même niche écologique et les mêmes exigences physiologiques lorsque les ressources sont limitées. En milieu fortement concurrentiel de la rhizosphère

Les *Trichoderma sp* ont, quant à eux, une aptitude supérieure aux autres organismes à mobiliser et à absorber les nutriments du sol (Darles, 2013). En effet, ce champignon serait capable de séquestrer les ions ferriques (indispensables au développement de tous les micro-organismes) en libérant des sidérophores. Ainsi, *Trichoderma sp.* montre bien sa capacité à être un compétiteur pour les nutriments (Verma et al., 2007). La compétition spatiale a lieu si *Trichoderma sp.* est appliqué en préventif car une installation précoce autour des racines permet de créer un manchon protecteur autour d'elles et ainsi contrer l'entrée des pathogènes dans la plante (Meriem, 2010).

## **2.4. Mycoparasitisme**

Le mycoparasitisme se manifeste par un changement de morphologie qui lui permet de s'enrouler autour du pathogène. Ce phénomène induit l'étranglement du pathogène et donc sa destruction. En outre, ce champignon forme des appressoria pour pénétrer à l'intérieur du pathogène. Une fois à l'intérieur, ce dernier dégrade les parois fongique du pathogène à l'aide de diverses enzymes (Meriem, 2010 ; Darles, 2013).

## **2.5 .Antibiose**

L'antibiose est un phénomène connu défini comme une interaction spécifique dans laquelle la cible est détruite par des métabolites secondaires toxiques produites par le micro-organisme de biocontrôle (Gerbore et al., 2013). Pour le *Trichoderma* étudié l'antibiose est associée à une production d'enzymes hydrolytiques. D'après Picard et al (2000),

En plus de produire des enzymes hydrolytiques, *T.asperellum* produit des peptaïbols (=les peptaïbols sont des peptides hélicoïdaux amphipolaires d'origine fongique, connus pour former des pores (Rippa, 2007)) ayant pour rôle de dégrader la paroi fongique (Verma et al., 2007).

Ces composés facilitent à la fois l'entrée des hyphes de *Trichoderma* sp. Dans le lumen du champignon et l'assimilation du contenu de la paroi fongique (Darles, 2013).

## **2.6. Stimulation des mécanismes de défense des plantes**

Le genre *Trichoderma* est connu pour la production de cellulase. Cette production est intéressante et efficace car ces enzymes induisent une réaction systémique dont les effets persistent pendant une quinzaine de jours en culture de melon, concombre, tomate et vigne sous serre (Blanchard et Limache, 2005). D'après ces mêmes auteurs, la protection conférée par ces cellulases atteint jusqu'à 60% sur melon contre FOC. Melonis. Une colonisation des racines à long terme, ainsi qu'une pénétration dans l'épiderme peut s'établir avec certaines souches de *Trichoderma* sp..

Ces champignons libèrent des composés reconnus comme éliciteurs par les plantes et qui induisent l'expression des gènes liés aux mécanismes de défense des plantes (Darles, 2013).

## **2.7. Stimulation de la croissance des plantes**

L'activité de *Trichoderma* sp. sur la croissance des plantes est due à la production d'hormones de croissance de type cytokinines et au transfert accru d'éléments minéraux de la rhizosphère (Benitez et al., 2004, Verma et al., 2010). Cette hormone améliore le développement, la résistance aux stress abiotiques, l'absorption et l'utilisation des nutriments par les racines (Benitez et al., 2004).

## 4. La lutte biologique et le biocontrôle

L'expression « lutte biologique » est apparue pour la première fois en anglais sous la forme « biological control » sous la plume de l'entomologiste américain, Harry Scott Smith, dans un article publié en 1919 dans la revue *Journal of economic entomology*

D'après un article de Decoin (2014) dans le magazine *Phytoma*, le biocontrôle est

« l'ensemble des méthodes de protection des végétaux (...) privilégiant l'utilisation de mécanismes et d'interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel (...) ». Les produits de biocontrôle peuvent être de quatre types : macro-organismes auxiliaires, micro-organismes, substances naturelles et médiateurs chimiques. Dans cette étude, l'agent de biocontrôle est un micro-organisme, il est donc considéré comme produit phytopharmaceutique. Depuis une dizaine d'années, les études sur les agents de biocontrôle ont augmenté de façon significative. Cependant, en Europe, seuls 14 produits de biocontrôle à base de champignons, oomycètes et bactéries, comme *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum* et *Bacillus* spp. sont inscrits au règlement n° 1107/2009 (Gerboire et al., 2013). Ces agents sont utilisés dans le but de limiter le développement des micro-organismes pathogènes dans la rhizosphère et la phyllosphère (Darles, 2013). Ces derniers possèdent différentes capacités selon l'espèce et la souche utilisée qui peuvent être classées en actions directes ou indirectes. Les actions directes sont les mécanismes mis en place par l'agent de biocontrôle contre le pathogène. Il s'agit du mycoparasitisme, de l'antibiose et de la compétition nutritive et/ou spatiale. Les actions indirectes sont les effets de l'agent de biocontrôle sur la plante hôte. Il s'agit principalement de la stimulation de la croissance des plantes et de l'induction des mécanismes de défense des cellules du végétal (Mc Quilken, 1990). La plante devient alors plus résistante aux agents pathogènes.

Dans cette étude, l'agent de biocontrôle testé pour lutter contre le pathogène *Fusarium oxysporum* est *Trichoderma asperellum*.

### 4.1. Définition et objectifs de la lutte biologique

Il existe de nombreuses définitions de la lutte biologique mais nous en tiendrons à une définition générale celle proposée par Van Driesche et Bellows (1996) : « La lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénéicité ou compétition ». La lutte biologique est donc l'utilisation d'organismes vivants

dans le but de limiter la pollution et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures « rongeurs, insectes, nématodes, maladies des plantes et mauvaises herbes » (Vincent et Coderre, 1992; Eilenberg et al., 2001., Jourdeuil et al., 2002).

Selon l'OILB : utilisation d'organismes vivants biopesticides, qui désigne aussi bien des organismes vivants que des substances inertes d'origine biologique, ou encore des produits phytosanitaires dits « biocompatibles », substances actives vivantes ou inertes d'origine biologique ou non, qui peuvent être employées en lutte intégrée (parasitoïdes, prédateurs, pathogènes, antagonistes ou compétiteurs) pour prévenir ou réduire les dégâts causés aux cultures par des ravageurs ou des maladies (Schiffers et Wainwright, 2011).

## **4.2. Importance de la lutte biologique**

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, essentiellement dû à de nombreux abus, à la présence des résidus qu'à une absence de vue globale des différents problèmes ; en particulier l'impact sur l'environnement. Les traitements chimiques deviennent dans certains cas insupportables sur le plan économique (Corbaz, 1990). Pour ces raisons la lutte biologique est une alternative viable de la lutte chimique (kouassi, 2001)

Selon Lefort (2010), la lutte biologique présente beaucoup d'avantage:

- ✓ Exposition fortement réduite de cultivateurs et des personnels de jet aux pesticides toxiques.
- ✓ Manque l'effet toxique sur les plantes et aucun avortement prématuré des fruits et des fleurs et augmentations de rendement.
- ✓ La lutte biologique est permanente.

## **I. Matériel utilisés**

### **A. Matériel biologique**

### **B. Matériel fongique**

#### **2.1. L'agent pathogène**

Les isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri* utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir des tiges des plants du pois chiche présentant des symptômes de flétrissement des plants et de jaunissement des feuilles, Ces isolats sont originaires de la région de Mascara (Algérie).

#### **2.2 L'agent antagoniste**

Les espèces de *Trichoderma* sp utilisés dans cette partie ont été obtenues à partir du sol agricole identifié et conservé sur milieu PDA au laboratoire de phytopathologie université de Bordj Bou Arreridj. Le tableau indique dans l'annexe résume les principaux isolats et leur origine géographique.

### **C. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué d'une variété de pois chiche GHAB 04. Cette variété nous a été fournie par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Tiaret, où elle est multipliée chaque saison.

## **1. l'évaluation de l'activité antagoniste in vitro du *Trichoderma harzianum* contre le FOC**

L'activité antagoniste in vitro des souches de *Trichoderma harzianum* , *T koningii* , *T luttea* ,*T lutea crystallina* , *T neoforum* ,*Tsubeffusa* vis-à-vis du FOC a été étudiée selon deux méthodes :

La méthode de confrontation par contact direct et par confrontation à distance, Cette étude avait pour but de sélectionner les souches le plus antagoniste sur la base des effets inhibiteurs. Les antagonistes sélectionnés seront testés sur l'expression de la maladie par un essai de lutte in vivo.

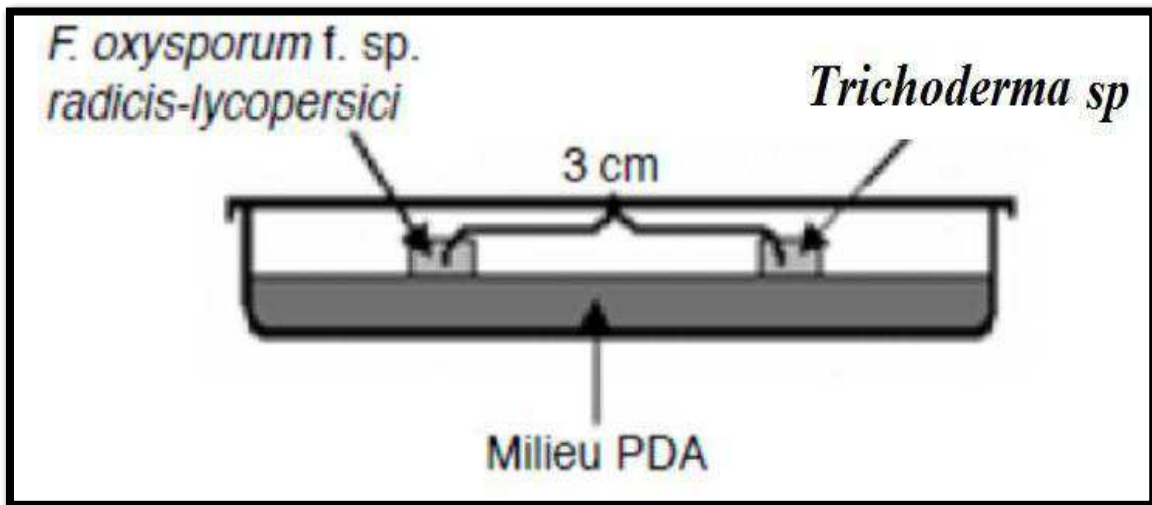
### **A. Confrontation par contact direct sur milieu de culture**

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant 15ml du milieu PDA, deux pastilles gélosées (3mm de diamètre), l'une portant le *Trichoderma* sp et l'autre le FOC.

Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte ; les repiquages sont effectués en même temps (Benhamou et Chet, 1996).L'incubation est réalisée à 25 °C pendant 4 jours.

L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24heures par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène.

**Le témoin** : est constitué par un repiquage du pathogène au centre de la boîte.

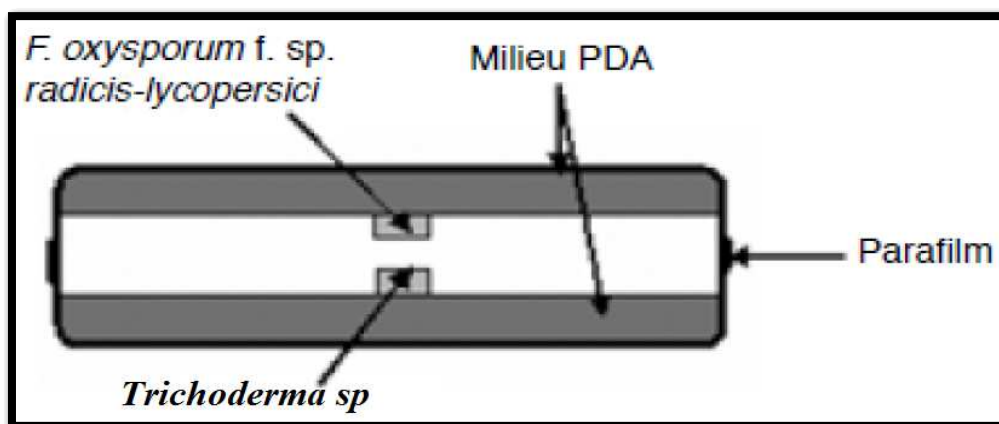


**Figure 03.** Confrontation par contact direct entre *Trichoderma* sp et FOC.

### B. Confrontation à distance sur milieu de culture

D'après (Comporota, 1985) cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes le *Trichoderma* sp en bas et le FOC en haut, La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de para film afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi, 2001). Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.

Le **témoin** est formé par superposition des deux boîtes, celle de haut contenant une pastille de FOC alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA.



**Figure 04.** Confrontation à distance entre *Trichoderma* sp et FOC sur milieu PDA.

### **1.1. Mesure de la croissance mycélienne**

La croissance mycélienne a été calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercés par les isolats de *Trichoderma* sp Ont été calculés selon la formule décrite par Leroux et Gredet, (1978) :

$$I(\%) = \frac{Co - Cn}{Co} \times 100$$

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

**Cn** : est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de l'agent antagoniste.

**Co** : est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de l'agent antagoniste.

Les résultats obtenus ont été traités par deux analyses indépendantes à l'aide de logiciel SPS 21. Trois répétitions sont retenues pour chaque facteur étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes par le test des moyennes par le test de Newman et Keuls à 5 %.

## **2. L'évaluation de l'activité antagoniste in vivo**

### **2.1. Préparation de l'inoculum**

Un mélange de volumes de terreau (sol, sable, terreau) autoclave pendant 2 heures à 120°C ; l'autoclavage a été répété 2 fois à 24 heures d'intervalle, puis placées dans petits pots en matière plastique, Ces pots contenant d'environ 300g du substrat stérile. Pour obtenir un mode d'inoculation qui puisse être valable, nous avons employé une technique couramment utilisée pour tester pathogène, Pour cela, nous avons préparé l'inoculum constitué FOC, ensuit enrobage des semences. Les boites sont mises à incuber.

### **2-2. Méthode d'inoculation**

Les graines de la variété du pois chiche GHAB04 sont tout d'abord désinfectées par immersion dans une solution de chlorure de sodium pendant 9 minutes puis dans l'eau distillé à 9 minutes afin d'éliminer toutes traces d'infections superficielles préexistantes et séchées par du papier filtre stérile. Les graines sont placées dans suspension sporale de chaque isolat de *Trichodema* sp pendant 30 minutes puis séchés à l'aide papier filtre stérile. Elles ont ensuite été semées dans des pots préalablement désinfectés à l'eau de Javel contenant le

terreau. Afin d'éviter des engorgements lors des arrosages. Ces pots sont laissés en chambre de culture pendant 15 jours. Les plantules sont arrosées chaque 48 heures.

### **2.3. Exploitation des résultats et analyses statistiques**

Les estimations sont fondées sur l'observation des symptômes et la notation de l'incidence (I) et de la sévérité (S) de la maladie. Lors de chaque visite, l'incidence et la gravité de la maladie ont été évaluées selon les méthodes de (Trapero-Casas, 1983).

### **2.4. Mesure de l'incidence**

L'incidence est le pourcentage des plantes malades ; il nous donne une idée sur l'état de la population de pois chiche vis-à-vis de l'agent pathogène. L'incidence est le moyen le plus rapide pour la mesure de la maladie ; il nécessite seulement le comptage du nombre d'unités malades qui peut être exprimé par un pourcentage du nombre total d'unités.

### **2.5. Mesure de la sévérité d'attaque**

La sévérité ou la gravité de la maladie est obtenue selon l'évaluation visuelle de la proportion des tissus de la plante atteinte par le flétrissement ou le jaunissement. L'échelle de notation utilisée par (Trapero-Casas, 1983) a été appliquée le long de nos expérimentations.

Cette échelle consiste à donner une note à la plante malade examinée en fonction de l'importance des symptômes observés:

0 : Pas de symptôme

1 : Jaunissement ou flétrissement du 1/3 de la plante.

2 : Même symptômes mais affectant les 2/3 de la plante.

3 : Symptômes identiques affectant la plante entière.

4 : plante morte

Pour estimer la gravité de la maladie, l'incidence moyenne de gravité (**ISM**) a été calculée pour chaque pots.

$$ISM = \frac{\sum nj, xi}{\sum nj}$$

Où **n<sub>j</sub>** est le nombre des plantes caractérisées par l'indices **ij** est **ij** l'indice de gravité de la maladie attribué aux plantes.



## 2.6. Calcul de l'Indice de flétrissement (DII)

L'incidence **I** et la sévérité **S** sont utilisés pour le calcul de l'index de l'intensité de la maladie **DII**

$$DII = S \text{ ou } (ISM) \times I/4$$

## 2.7. Calcul de l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve)

La région sous la courbe du progrès de la maladie (**AUDPC**) est une méthode d'analyse qui permet de résumer les données de l'intensité de la maladie, en une seule valeur. Cette valeur est indispensable pour la comparaison entre les différentes épidémies à travers les années, les emplacements, ou les stratégies de la gestion (Cook, 2006). Cependant, cette méthode est utile pour la description, l'estimation et la comparaison entre les épidémies causées par le FOC (Navas-Cortes et al., 2000). L'**AUDPC** est calculé en utilisant la formule suivante :

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(x_{i+1} + x_i) / 2] (t_{i+1} - t_i)$$

Où  $x_i$  = la proportion des tissus ou le nombre de plantes malades à toute une seule mesure (intensité de la maladie) à l'observation  $i$ ,  $t$  = temps (jours) après l'inoculation à l'observation  $i$ , et  $n$  = le nombre total d'observations. La somme de régions individuelles trapézoïdes, ou régions de  $i$  à  $n-1$ .  $i$  et  $i+1$  représente des observations de 1 à  $n$ .

Les mesures des caractéristiques épidémiologiques (**I**, **S**, **DII**) sont soumises à des analyses de variance, chaque variété étant représentée par trois répétitions pour un seul variable (variété) et deux variables (isolats).

## 2.8. Analyse statistique

Trois répétitions sont retenues pour chaque facteur étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une analyse de variance des moyennes par le test des moyennes par le test de Newman et Keuls à 5%. L'analyse statistique a été faite avec une procédure générale des modèles linéaires avec SPSS21.

## 3. La fermentation fongique en milieu liquide

### A. Le milieu de culture

Selon Michel (2001); La production des métabolites secondaires fongiques bruts (MSFB) est effectuée par la fermentation fongique en milieu liquide, afin de repiquer régulièrement les isolats fongiques et incubés à 24 °C pendant une semaine dans le milieu

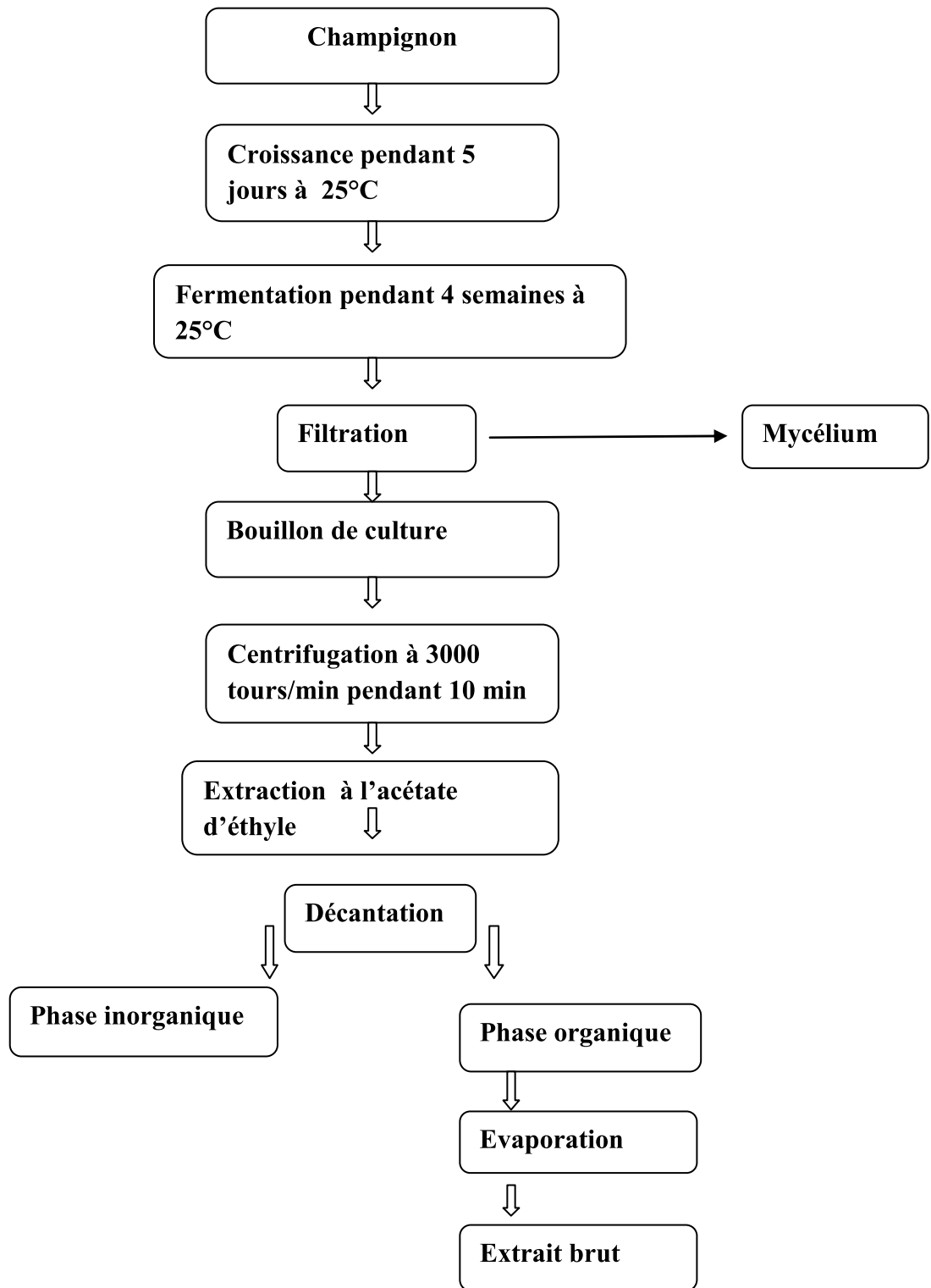
PDA 2200 ml de milieu de culture est préparé et répartie dans 22 erlemeyers de 250 ml. Chacun contient 100 ml, bouché par bouchon d'ouate recouvert d'une feuille d'aluminium afin d'éviter la contamination. Ils sont mis à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes (Botton et al.,1990). Nous découpons des morceaux d'environ 5 mm de diamètre de coté de mycélium cultivé précédemment dans le PDA pendant une semaine à 24 °C.

Quatre morceaux sont mis dans chacun des erlenmeyers. Le col des erlemeyers et les ustensiles entre chaque inoculation sont stérilisés à la flamme, pour éviter toutes contaminations. Ensuite l'incubation est faite à 24 °C pendant 3 à 4 semaines.

### **B. procédure d'extraction**

Après la période optimale de 4 semaines, on a filtré le milieu à l'aide d'un papier filtre N°01 de 18.5 cm pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat; qui est par la suite centrifugé à 5000 rt/min pendant 15 minutes, le culot est jeté puisque il contient le reste de mycélium et les spores, et donc le surnageant est extrait par son même volume d'Acétate d'Ethyle (V:V). Ce dernier est choisi comme meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon Badji et al., (2005); Gogoi et al.,(2008); Qin et al., (2009). Ensuite on le met en contact prolongé. Le mélange est agité à 120 tours/min pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique à température 40°C, puis laissé décanter dans une ampoule de décantation pour séparer la phase aqueuse à la phase organique, la phase aqueuse est extraite par même méthode. Enfin, on mélange les deux phases organiques qui ont pour obtenir les métabolites secondaires bruts.

Par la suite; on a évaporé la phase organique résultante sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur), on pèse les résidus, et on les dilués au (Diméthyle de Sulfoxide (DMSO: Eau) (1:9) pour obtenir l'extrait brut à une concentration de 20 mg/ml à conserver à 4°C jusqu'à leur utilisation. Enfin, on a conclut par la procédure d'extraction; l'extrait brut des métabolites secondaires fongiques MSF **figure05**.



**Figure 05.** Fermentation et extraction des métabolites secondaires des souches fongique (Zerroug, 2011).

### **4.3. Détermination de la biomasse par poids sec**

Le mycélium obtenu est séché à 105° C pendant 1 heure jusqu' à poids constant.

### **L'application des métabolites secondaires (extraits bruts)**

#### **5.1. L'application in vitro**

La détermination de la sensibilité des champignons pathogènes aux antifongiques impose des méthodes rapides, précises et normalisées. La technique utilisée dans cette étude est celle de l'incorporation directe de l'extrait brut des métabolites secondaires au milieu de culture PDA, dans 50 ml de PDA en ajoutant à l'aide d'une micropipette les différentes concentrations des extraits bruts (100ppm, 500ppm, 1000ppm, 2500 ppm, 5000ppm).

Après l'agitation du tube, le milieu est coulé dans des boîtes de pétrie, l'inoculation se fait par le dépôt au centre de la boîte un morceau de 3 mm de diamètre de mycélium de FOC et fermé par une couche de parafilm, l'incubation est réalisée à 25 °C. L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24 heures par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène. (Zerroug, 2011).

## 1. Résultat

### 1.1. L'évaluation de l'activité antagoniste in vitro du *Trichoderma* sp contre le FOC

#### 1.1.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture

Les tests de confrontation directes réalisés in vitro entre les souches de *Trichoderma* sp avec le FOC, sur milieu PDA mis en évidence le pouvoir mycoparasitaire de *Trichoderma* sp et inhibe efficacement la croissance mycélienne et la germination conidiennes de ce dernier cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé et elle a été choisie pour une première sélection car elle est plus simple et rapide.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre le *Trichoderma* sp et le FOC montre une modification profonde au niveau du mycélium d'espèce pathogène, se marquant par une lyse important, une transformation en cordons des filaments mycéliens et en enroulement du mycélium du *Trichoderma* sp sur le FOC. Les six antagonistes testés se sont révélés efficaces en inhibant la croissance mycélienne de FOC testé. La réduction de croissance mycélienne varie de 69 à 80 %. Les souches *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* appariaient plus efficace chez FOC.

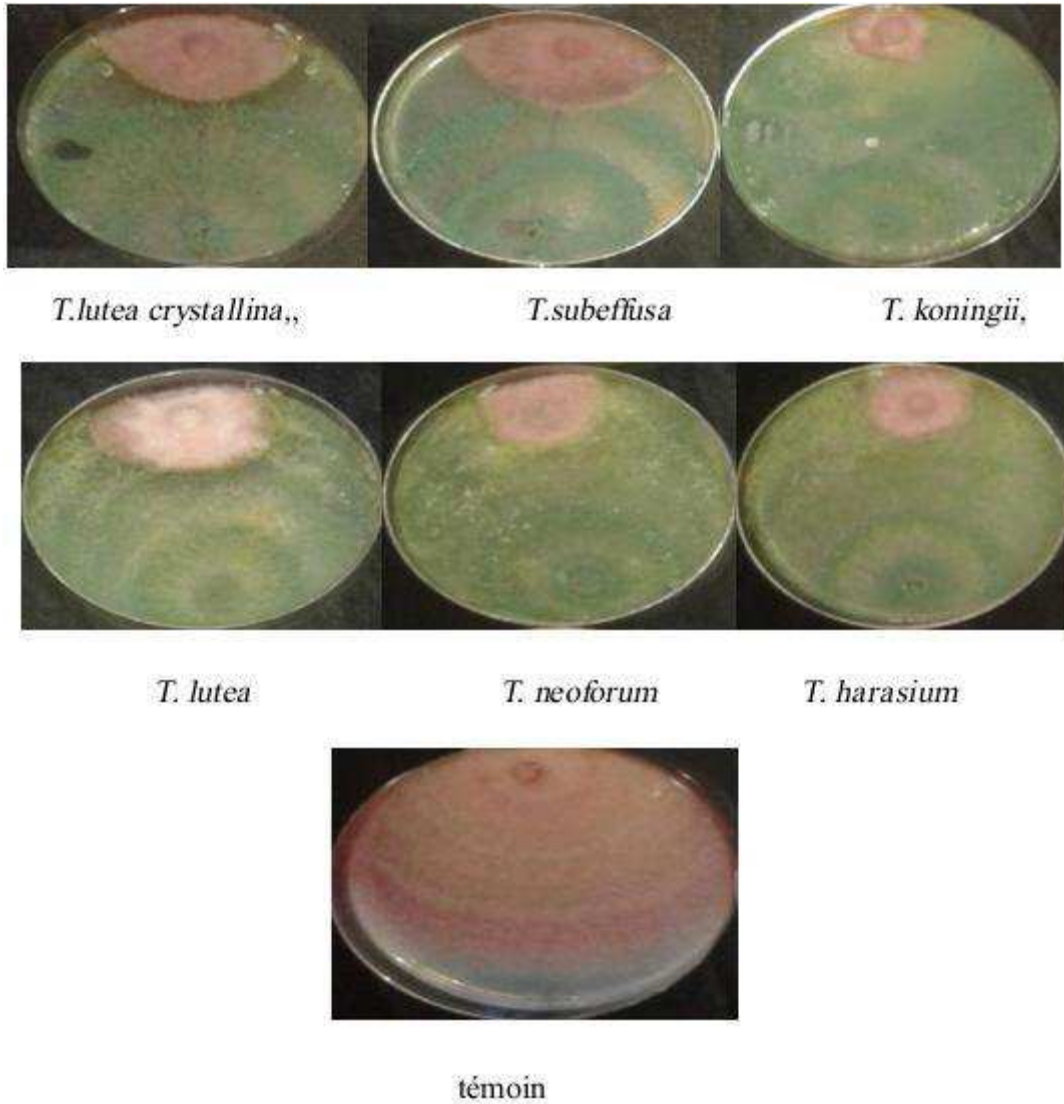
Après deux jours de confrontation, l'inhibition de la vitesse devient très forte et la croissance de FOC devient pratiquement nulle. La capacité de *Trichoderma* sp a inhibé la croissance mycélienne de FOC et révèle un effet fongistatique avéré.

Après quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste. Les isolats phytopathogènes n'occupent qu'une surface allant de 19 mm à 21 mm. Le témoin correspondant au pathogène cultivé seul occupe une surface allant de 85 mm à 68Mm de diamètre.

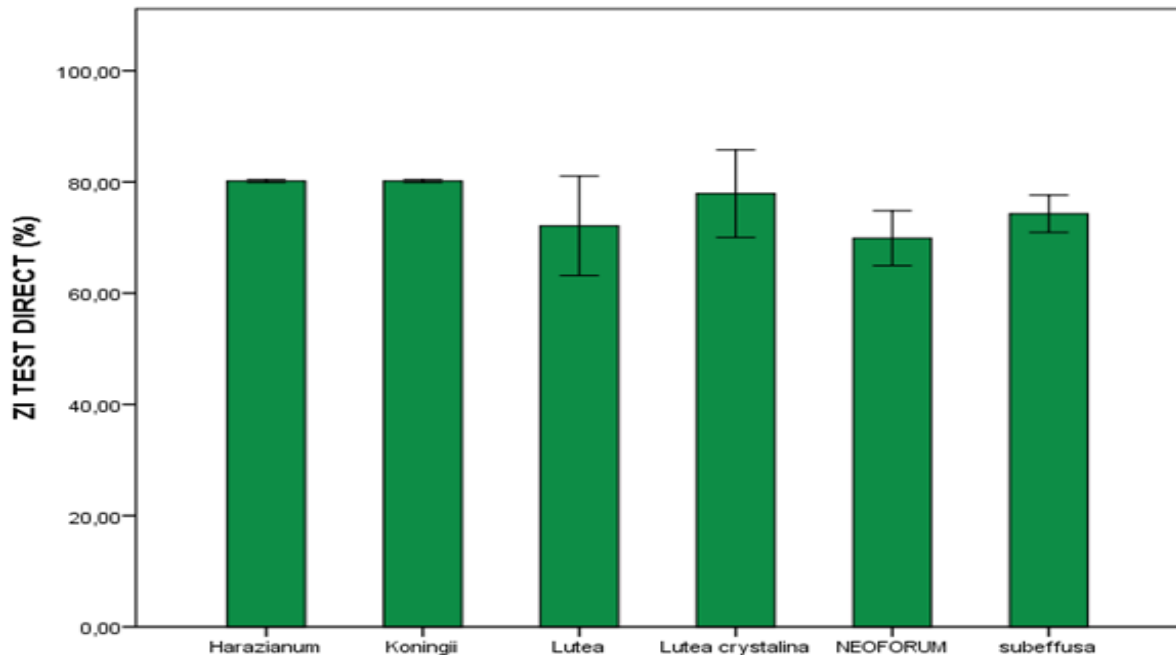
Après 8 jours nous avons constaté l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour l'ensemble des souches, les résultats sont illustrés par la **Figure 06**.

Les résultats analysés par l'ANOVA ont montré un effet non significatif entre les souches testés sur la croissance mycélienne de FOC. Cet effet non significatif se traduit par un regroupement des souches en fonction de leur ressemblance vis-à-vis du taux d'inhibition de la croissance mycélienne de FOC. L'étude et la comparaison de l'efficacité des souches contre le FOC ont montré une réduction significative de la croissance et de la sporulation du FOC. Ainsi, le pourcentage de réduction de la croissance mycélienne et de sporulation les

plus élevés sont obtenus avec la souche *Trichoderma Koningii* 80,43% suivis par et *Trichoderma harasium* 80,14%. Tous les résultats sont illustrés par **Figure 07**.



**Figure 06.** La Confrontation par contact direct de *T. lutea crystallina*, *T. subeffusa* et *T. koningii*, *T. neoforum*, *T. lutea* et *T. harasium* vis-vis FOC avec le témoin.



**Figure 07.** Présentation des résultats du test de confrontation direct entre *T. koningii*, *T. lutea*, *T. lutea crystallina*, *T. subeffusa*, *T. neoforum*, *T. harasium* et *Fusarium oxysporum*.

## 1.2. Confrontation à distance

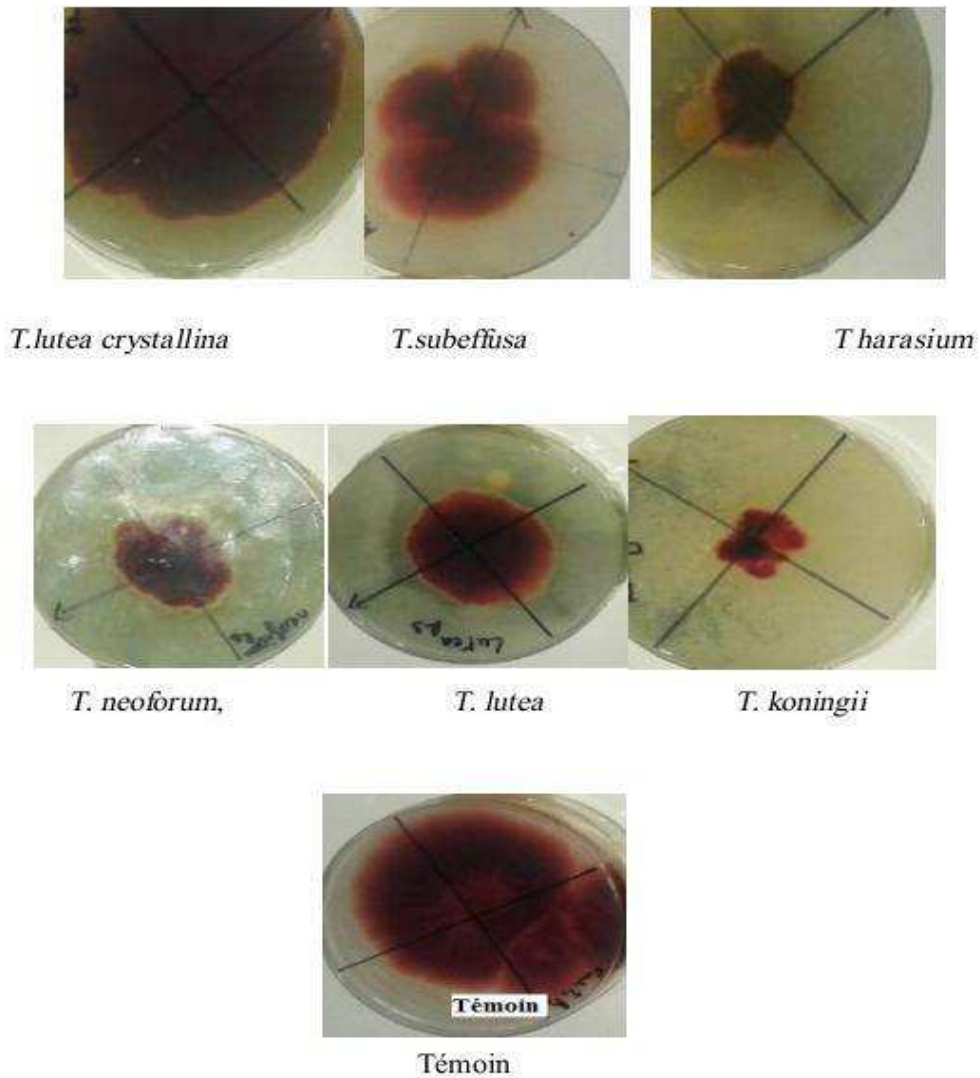
L'action antagoniste de l'agent de lutte biologique *Trichoderma*. À été vérifié in vitro vis-à-vis de FOC. Les essais de confrontation à distance sur milieu de culture entre les deux protagonistes le FOC et *Trichoderma* sp ont révélé que ce dernier à inhiber la croissance mycélienne de pathogène **Figure 08**.

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même a distances des *Trichoderma* sp exercé sur le FOC, cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de ce dernier cultivé en présence ou en absence de l'antagoniste.

Il ressort que, malgré l'absence d'un contact directe entre le FOC et *Trichoderma* sp Ce dernier a exercé une activité inhibitrice sur le développement des colonies de FOC, ceci expliquerait par l'aptitude de *Trichoderma* sp à produire des substances volatiles qui sont capable de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène. Contrairement aux testes de confrontation direct, on remarque que la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps.

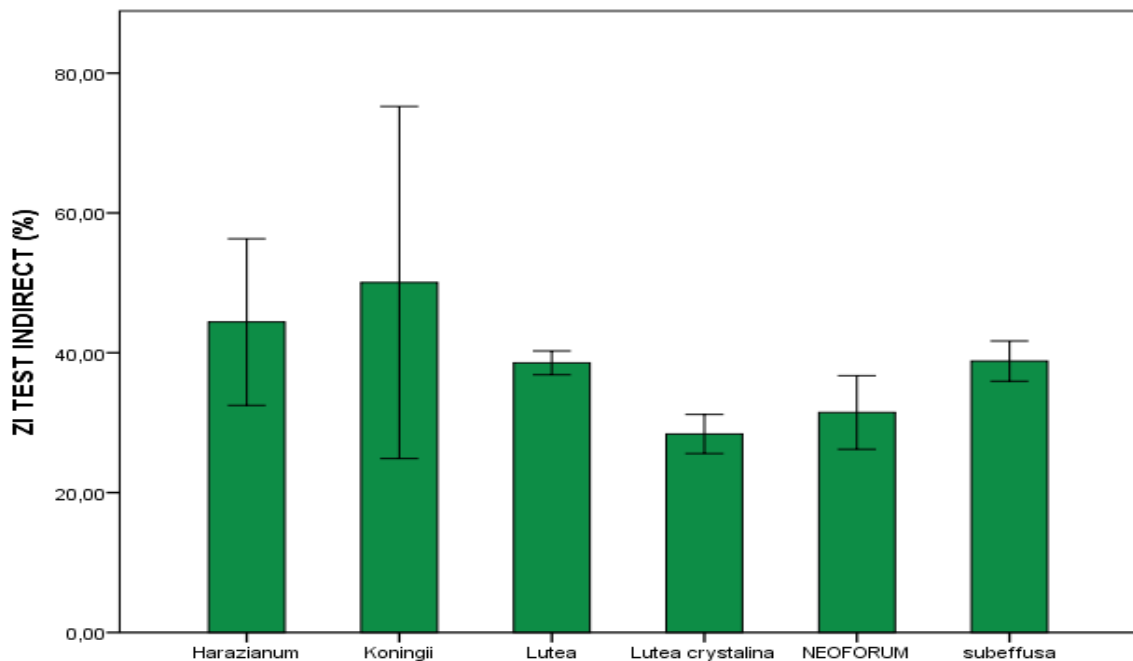
L'ANOVA a montré un effet non significatif de la souche testé sur la croissance mycélienne de FOC. Cet effet se traduit par un regroupement des souches en fonction de leur ressemblance vis-à-vis le taux d'inhibition de la croissance de mycélienne de FOC.

Les résultats obtenus après six jours d'incubation à 25°C montrent une nette réduction du diamètre moyen des colonies de FOC en présence de *Trichoderma* sp avec un taux d'inhibition pour la souche *T. harasium* 44,39 et *T. koningii* 50,04 **Figure 09**.



**Figure 08.** La Confrontation par contact direct de *T. lutea crystallina*, *T. subeffusa* et *T. harasium*, *T. neoforum*, *T. lutea* et *T. koningii* vis-vis FOC avec le témoin.





**Figure 9.** Présentation des résultats de test de confrontation indirect entre *T. koningii*, *T. lutea*, *T.lutea crystallina*, *T.subeffusa*,*T. neoforum*, *T. harasium* et *Fusarium oxysporum*.

## 2. L'évaluation de l'activité antagoniste in vivo

Le test antagoniste in vivo a prouvé l'efficacité des souches de *Trichoderma* sp. À réduire l'indice de la maladie du flétrissement vasculaire du pois chiche. Les plantes traitées par le *Trichoderma* sp présentent une croissance végétative meilleure. Chez le témoin l'inoculation de variété du pois chiche GHAB04 par le pathogène a montré l'apparition des symptômes caractéristiques de la maladie. Les symptômes observés sont caractérisés par un relâchement des pétioles, un flétrissement des feuilles qui avaient pris une couleur vert-terne, suivi du dessèchement de la plante l'incidence allant de 29 à 41 % et la sévérité variant de 4,0 à 8,4

### Figure 10

Les traitements préventifs et simultanés par les *Trichoderma* entraînent une réduction importante exprimé par la gravité de la maladie par rapport aux semences non traités, la réduction des symptômes observé chez les cultivars en utilisant les 6 isolats de *T. koningii*, *T. lutea*, *T.lutea crystallina*, *T.subeffusa*,*T. neoforum*, *T. harasium* en comparaison avec les témoins inoculés uniquement par le pathogène, les résultats présents dans la **Figure11, 12 et 13**



Figure 10: Résultats sur témoin inoculé par le FOC.



Figure 11: Effet protectif de *T. subeffusa* et *T. lutea* crystalina chez la variété GHAB04.



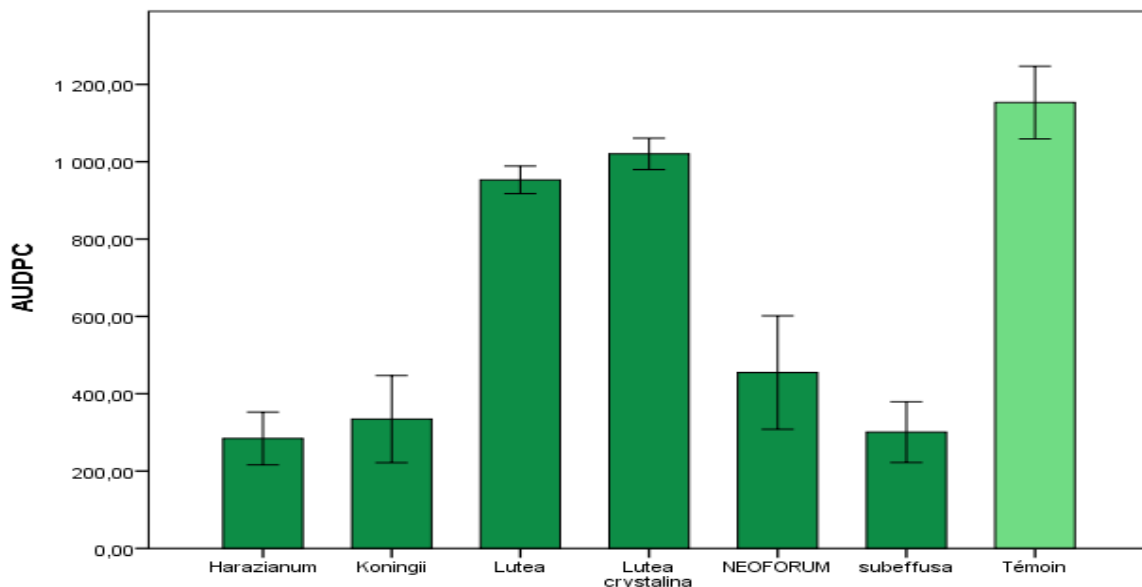
Figure 12: Effet protectif de *T. lutea* et *T. harasium* chez la variété GHAB04.



**Figure 13:** Effet protectif de *T. koningii* et *T. neoforum* chez la variété GHAB 04

L'analyse des valeurs de l'AUDPC par L'ANOVA montre que il y un effet hautement significatif sur les souches testés. Cet effet se traduit par le degré de la suppression de la maladie par *Trichoderma* sp est varié d'une souche à une autre, il deviens plus ou moins élevé après le traitement de la variété GHAB04 par les souches *Trichoderma harazianum* et *Trichoderma koningii*.

Les valeurs sont par l'ordre qui suit (28,43%, 33,43%). On remarque que tous les isolats testés réduisent significativement l'intensité de la maladie par rapport au témoin .les résultats obtenus sont présentés par la **Figure 14**



**Figure 14 :** Evaluation de l'activité antagoniste in vivo de *T. koningii*, *T. lutea*, *T.lutea crystalina*, *T.subeffusa*,*T. neoforum*, *T. harasium* .

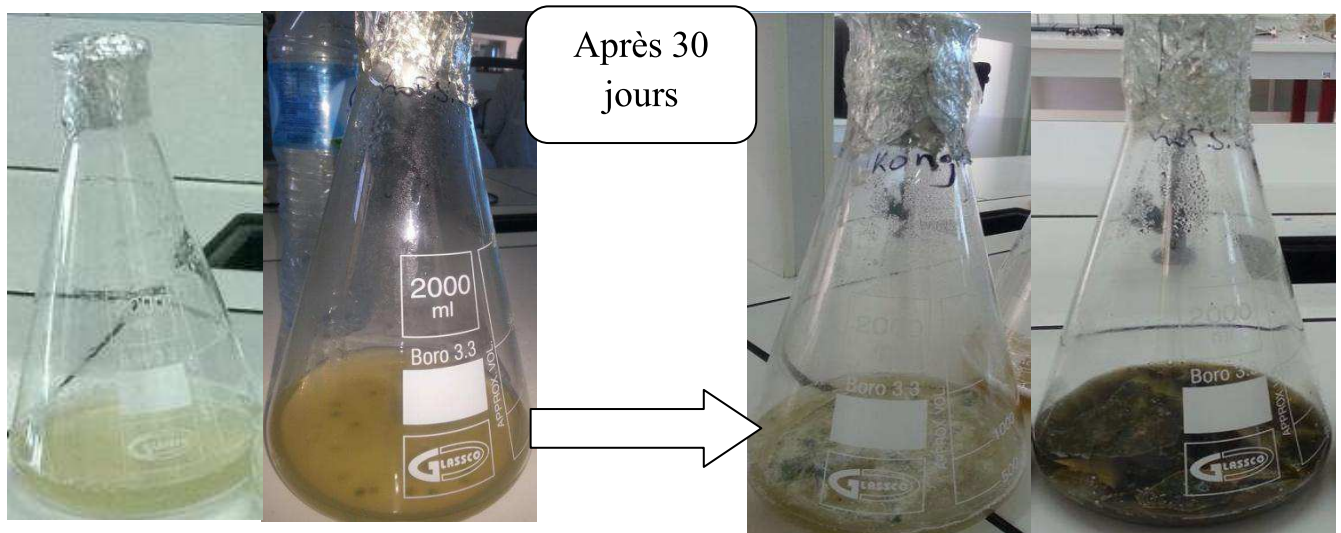
### 3. Effet de métabolite secondaire

#### 3.1. Détermination de la biomasse par poids sec

On observe au départ une formation des anneaux transparents (3jours), ensuite après 7jours, sont devenus blanc, épais, puis jaune-blanc à la fin de la fermentation (14jours) bien définie et attaché chez les souches de *T.koningii* et les souches de *T. harzianum* déviants vert puis la couleur devient plus foncé avec le temps, les résultats de fermentation sont représentés dans la **Figure 15**.

Après la période optimale de la fermentation, la filtration de la biomasse du milieu(Bouillon) et l'extraction par le solvant organique l'acétate d'éthyle donne une phase claire et transparente chez les souches *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* et une phase l'acétate d'éthyle de couleur jaune sans

Le mycélium obtenu après la période de fermentation des souches de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* a été séché à 40° C pendant 1heure jusqu' à poids constant, puis pesé. Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne et rapide de celle qui a été observée chez les souches est : *T. harzianum* 2.07 g, *T.koningii* 3.9 g.



**Figure 15:** Le poids sec de la biomasse issue des milieux de fermentations de *T. harzianum* et *T. Koningii*.

L'évaluation de l'activité antifongique des différentes concentrations des extraits bruts repose sur le calcul des taux d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (FOC). Les tests antifongiques ont révélé que les métabolites secondaires bruts *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* possèdent une activité antifongique dont l'intensité varie à chaque concentration de l'extrait.

L'évolution du mycélium aux différentes concentrations est plus distincte, elle est plus réduite sur le milieu de culture.

D'après l'ANOVA, la souche et la concentration et l'interaction entre les deux facteurs ont montré un effet très hautement significatif sur la variation de la zone d'inhibition (ZI) **Figure 16.**

L'emploi de l'extrait brut a permis de réduire significativement la croissance mycélienne de FOC, comparativement aux témoins non traités, le taux d'inhibition le plus élevé est observé dans la concentration de souche *T.Harasium* 5000 ppm 59,90%, En revanche, les faibles valeurs de la zone d'inhibition sont observées dans la concentration 100ppm 17,61%. Cette mesure nous a permis de classer les extraits testés selon leur degré d'efficacité contre les isolats de FOC: 5000ppm > 2500ppm > 1000ppm > 500ppm > 100ppm avec les taux d'inhibition suivant (59,90%, 43,4%, 43%, 26,1%, 17,61%) .

Pour le taux d'inhibition le plus élevés pour la souche *T.Koningii* il est observé avec la concentration 5000 ppm 52,36%, En revanche, les faibles valeurs de la zone d'inhibition sont observées avec les concentrations 100ppm 4,08%. Cette mesure nous a permis de classer les extraits testés selon leur degré d'efficacité contre les isolats de FOC comme suit: 5000ppm > 2500ppm > 1000ppm > 500ppm > 100ppm avec les taux d'inhibition qui sont représentés successivement (52,34%, 41,04%, 28,29%, 12,57%, 4,08%) .L'analyse statistique a montré un effet très hautement significatif entre les souches testées sur la croissance mycélienne de FOC. Cet effet significatif se traduit par un regroupement des souches en fonction de leur ressemblance vis-à-vis le taux d'inhibition de la croissance de mycélienne de FOC



C1 T,harzianum. C2 T. harzianum. C3 T. harzianum. C4 T. harzianum. C5T. harzianum.

Figure 16: Effet de l'extrait brut de T. harzianum sur la croissance mycélienne du FOC.



C1 T,koningii. C2 T.koningii. C3 T. koningii. C4 T. koningii. C5T. koningii.

Figure 17 : Effet de l'extrait brut de T. koningii sur la croissance mycélienne du FOC.

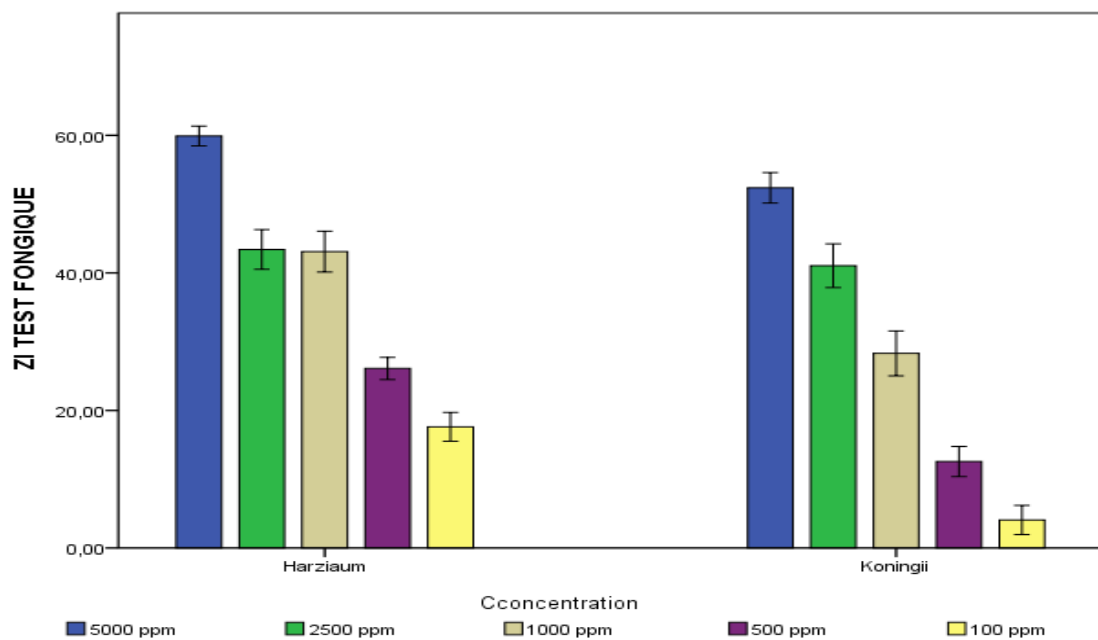


Figure 18. L'effet de l'extrait brut de T. harzianum et T. koningii sur la croissance mycélienne du FOC.

## **Discussion**

Dans cette étude, nous avons évalué in vitro et in vivo le pouvoir antagoniste de *T. koningii*, *T. luttea*, *T. lutea crystallina*, *T. neoforum*, *T. subeffusa* vis-à-vis du FOC champignon foliaires et racinaires du pois chiche dans le but d'améliorer les qualités nutritionnelles du milieu de culture actuellement employé pour multiplier *Trichoderma*.

Les champignons du genre *Trichoderma*, connus depuis 1887 pour leurs propriétés antagonistes à l'égard des nombreux champignons *Fusarium oxysporum*, *Pythium*, *Botrytis cinerea* (Poddar et al., 2004) elle est renferme des espèces utilisées en tant qu'agents de lutte biologique contre les phytopathogènes et comme source d'enzymes et de métabolites secondaires d'intérêts biotechnologique (Kubicek et Penttilä, 1998 ;Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998).

Généralement, *Trichoderma* inhibe ou dégrade la pectinase et d'autres enzymes qui sont essentiels pour les phytopathogènes. En plus de son effet inhibiteur sur le développement des phytopathogènes.

Nos résultats s'accordent avec (Markuz et al., 2012) les espèces de *Trichoderma* sp impliquent dans le mécanisme d'inhibition l'enroulement des hyphes autour de l'agent pathogène, l'effet antagoniste de *Trichoderma* sp est tout simplement associé à un comportement parasitaire et se manifestant par un enroulement des hyphes autour des filaments du champignon parasite (Elad et al., 1983), la pénétration, la production de l'haustoria et la lyse des hyphes puis la disparition du mycélium de l'agent pathogène FOC.

Le repiquage simultané de *Trichoderma* sp de l'espèce de FOC montré une croissance plus rapide de *Trichoderma* des isolats de FOC. Au bout de quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, alors que l'espèce de FOC occupent une surface de 20mm de diamètre; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 65%. Le témoin FOC cultivé seul occupe une surface d'environ 50mm de diamètre. Au delà de cette période et au terme de six jours, *Trichoderma* envahit les colonies de FOC. et sporule même sur celles-ci, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire (Benhamou, Chet, 1996; Daami-Remadi, 2001; Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001). L'envahissement du mycélium du pathogène par *Trichoderma* sp a également été observé par Benhamou et Chet (1997).

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre *Trichoderma* sp et FOC, montrent une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une lyse importante et une transformation en cordons des

filaments mycéliens en plus d'un enroulement du mycélium du *Trichoderma* sp sur celui du Foc. nos résultats s'accordent avec (Markuz et al., 2012)

Les essais de confrontation à distance sur milieu de culture entre les deux protagonistes ont révélé que ce dernier à inhiber la croissance mycélienne de pathogène (Poddar et al., 2004). Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance du *Trichoderma* sp exercé sur les isolats de FOC ; cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de ce dernier cultivé en présence ou en absence de l'antagoniste. Les résultats obtenus montrent une nette réduction du diamètre moyen des colonies de FOC en présence de *Trichoderma* sp par rapport au témoin.

Il ressort que malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de FOC testés et *Trichoderma* sp, ce dernier a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies de FOC. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de *Trichoderma* sp à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène.

Des observations microscopiques réalisées au niveau du mycélium de FOC. En présence de *Trichoderma* sp ont révélé la présence d'une lyse importante et une transformation en cordons du mycélium du pathogène et ce comparativement au témoin. Cela confirme les observations de la confrontation directe illustrées Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Chérif et Benhamou (1990) qui ont signalé la présence d'altérations avec une perte cytoplasmique du mycélium de FOC suite à l'action du *Trichoderma* sp , malgré l'absence de contact direct entre les deux champignons.

Notre étude à révélé que la diversité des agents de lutte biologique tels que *Trichoderma* sp peuvent être un élément utile de la gestion intégrée de la fusariose vasculaire du pois chiches. Le FOC, responsable d'importants dégâts durant tout le cycle vital de la plante hôte, chez les légumineuses, il est transmis essentiellement par les semences.

Nos résultats s'accordent avec ceux de Mokhtaria, 2010 le FOC provoque d'abord un flétrissement du feuillage progressant du bas de la plante vers le haut avec une ramification des racines secondaire. Il pénètre dans les racines par des blessures et développe le



plus souvent un mycélium blanc. Les premiers symptômes de contamination par FOC sont des jaunissements et flétrissements unilatéraux des feuilles. On observe également sur les tiges des stries longitudinales brunes.

Le but de ce travail est de savoir si les 6 souches de *Trichoderma* sp sélectionnés sont capables d'éliminer ou de réduire le flétrissement chez la variété du pois chiche sensibles et modérément résistantes envers l'isolat de FOC sous les conditions in vivo.

D'après Harman, (2000) en plus de son effet inhibiteur *Trichoderma* sp est aussi capable d'induire une résistance localisée et systématique. L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu soit au niveau de la plante soit au niveau du sol (Lindsey et al., 1967). Ces champignons colonisent l'épiderme des racines et les couches corticales externes et libèrent des molécules bioactives.

Le traitement des graines est apparu efficace contre le FOC. En effet, une nette réduction de l'indice de maladie des plantes traitées par rapport aux plantes inoculées seulement par FOC est observée. Ainsi, la souche *T. harzianum* offre la meilleure protection avec un pourcentage de réduction de l'indice de maladie de 75%.

Ces résultats ont été confirmés par Zaime et al., (2008), l'enrobage des graines du pois chiche avec la souche *Trichoderma* en raison de 107 spores/ml a permis de réduire la gravité de la fusariose et d'empêcher l'expression du FOC à 83.4% ainsi que d'améliorer la croissance végétative et le système vasculaire des plantes traitées.

Davet et al., (1981) ont montré que lors de l'inoculation du sol par le *Trichoderma* sp, il est nécessaire d'introduire l'inoculum avec un support qui lui fournit une base nutritive suffisante pour échapper temporairement à la compétition des autres microorganismes telluriques. Ainsi, la tourbe adhérent aux racines des plantules est utilisée comme support physique afin de permettre à l'inoculum du *Trichoderma* de se multiplier au cours des premiers jours loin de l'influence des populations microbiologiques du sol.

Les champignons du genre *Trichoderma* sont généralement utilisés comme produit de base pour de nombreuses préparations phytosanitaires, destinées au traitement des maladies cryptogamiques (Yedida et al., 2001).

Les résultats du test de l'activité antifongique des différentes concentrations des extraits de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* ont montré que les métabolites secondaires jouent un rôle efficace dans l'inhibition de la croissance de l'agent pathogène et empêche l'expression des symptômes de la maladie. (Martin et Liras, 1989)

Harman (2000) a rapporté que les espèces de *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes reliées aux sols, aussi bien que pour la dégradation des composés toxiques présents dans les sols. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation.

*Trichoderma* est un champignon du sol, filamenteux, connu comme un agent de biocontrôle efficace contre certains pathogènes du sol. Il est l'agent de biocontrôle le plus étudié contre les phytopathogènes. Weindling et Emerson (1936) ont démontré que *Trichoderma* est capable de sécréter une substance extracellulaire, appelée « Gliotoxine », capable de dégrader les pathogènes. *Trichoderma* a été connu comme producteur de substances antibiotiques et parasite d'autres champignons (Lindsey et al. 1967; Chang et al. 1986).

## **Conclusion**

Les maladies fongiques, en Algérie, constituent pour les différentes cultures agroalimentaires un problème phytosanitaire majeur et constituent également un facteur limitant bien pour la production et le rendement que pour la valeur ajoutée des produits destinée à la consommation. Les recherches sur la lutte biologique ont comme objectif principal le développement et l'amélioration de moyens alternatifs de lutte afin de limiter l'utilisation des pesticides chimiques synthétiques et leurs impacts négatifs sur l'environnement et la santé publique.

Ce travail porte sur l'activité antagoniste ; les essais de la lutte biologique à l'aide de ces isolats fongiques ont montré qu'il était possible de limiter l'incidence du FOC, bien que le niveau de protection ne soit pas assez important. Néanmoins, l'utilisation de ce traitement biologique permet de maintenir la maladie à un seuil acceptable.

En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt essentiel d'utiliser les espèces de *Trichoderma* sp en tant qu'agent de lutte biologique contre la fusariose vasculaire du pois chiche causée par FOC d'autant plus que les produits chimiques actifs contre ce pathogène sont en nombre relativement réduit. Un test d'activité antagoniste, qui a pour but de sélectionner le ou les isolats les plus antagonistes, a été réalisé.

les tests de confrontation directe et indirecte et l'analyse des valeurs de l'AUDPC, on constate que les souches *Trichoderma harazianum* et *Trichoderma koningii* envahit les colonies et exerce une action d'inhibitrice très important sur la croissances mycélienne et la germination conidiennes du FOC dans le taux d'inhibition (*Koningii* 80,43suivis par et *T harasium* 80 ,14%), dans le cas de confrontation à distance *Trichoderma harazianum* et *Trichoderma koningii* peut agir par son pouvoir mycoparasitaire et la sécrétion des substances volatiles qui sont capables de stopper le développement du FOC ( *T. harasium* 44,39 et *T koningii* 50 ,04)

Le test antagoniste in vivo a prouvé l'efficacité des isolats de *Trichoderma* sp. A réduire l'indice de la maladie du flétrissement vasculaire du pois chiche. Les plantes traitées par le *Trichoderma* sp. présente une croissance végétative meilleure, les valeurs de l'AUDPC montre également que le degré de la suppression de la maladie par

Trichoderma sp après le traitement de la variété GHAB 04 par les isolats (T. harzianum 28,43%, T.Koningii 33,43%).

La protection des cultures est une composante essentielle de l'agriculture. Il est indispensable de prévenir et de gérer l'infestation des cultures par les maladies et les ravageurs de manière à stabiliser les productions et à en améliorer la rentabilité. La lutte chimique, largement appliquée dans le domaine des maladies et des ravageurs, n'a jamais apporté de solution durable. Cependant, suite à l'emploi abusif des pesticides il s'est avéré que des perturbations sont apparues à différents niveaux.

À cause de l'augmentation de contraintes environnementales et économiques inhérents de l'utilisation de pesticides chimiques. Dans ce contexte, on a pensé à l'utilisation des agents non polluants et non toxiques (microorganismes) pour défendre les cultures comme une lutte durable, biologique et efficace.

- Badj B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N.**( 2005). Activite antifongique d'unesouche d'Actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de mycologie médicale 15(2005):211-219.
- Belanger, R.R., N. Dufour, J. Caron Et N. Benhamou.** (1994). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* 5 : 41-53.
- Bellows , T.S., Ficher ,T.W .**(1999).Handbook of biological control principal and application biological control .Academic press .32:841-851.
- Benhamou, N., Chet, L.,** (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*.86 :405-416.
- Benhamoun., Cheti.** (1997): Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p.2095–2099.
- Benitez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains.*International microbiology*, v.7, n°4, pp. 249-260.
- Bissett J.** (1991): A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* N°69:2357–2372.
- Bissett, J.** (2004): Commentaires de l'adresse internet suivante : [http://www.Medicalglossary.org/fungi\\_mitosporic\\_fungi\\_definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).
- Blanchard A. et Limache F.** (2005). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). DAA Protection des plantes et environnement, 2005. 18 p.
- Blumenthal, C.Z.**2004: Production of peptide metabolites in *Aspergillus niger*, *A. oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. pharmacol.*, 2004, 39 (2) : 214-228.
- Böhnert et al.,** (2004): A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe*.
- Botton ;Breton,A ;Fevre,M ;Guy,Ph ;Larpeni,J ;P;Veau.**(1990).Moisissures bouw bog school wagenigen, Nederland, 72 p
- Champion R.** (1997). Identifier les champignons transmis par les semences : Techniques et pratiques. Ed. Quae, Paris, 398 p.
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld et I. Chet.** (1986). Increased growth of plants in the presence of chiche et de la lentille. Mémoire de magister, université de Mascara., 113:59-56. Commonwealth Mycological Society, Kewen, Angleterre, pp. 35-57.

- Comporata.,** (1985). « Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp vis à vis de *Rhizoctinia solani*, INRA Paris (FR). 55 : 613-620 conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.
- Cooke B.,** (2006). Disease assessment and yield loss. In D.G.Jones(Ed), *The Epidemiology of plant Diseases*. Kluwer publishers, Dordrecht, The Netherlands. 33: 42-71.
- Cournut, B.** (1984): Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th. : Pharmacie : Marseille ,77 p.
- Daam I., Remadi, M., El Mahjoub, M.,** (2001). Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann l'INRAT*. 74 :167–186.
- Daami., Remadi, M.** (2001) : Lutte biologique contre les *Fusarium* spp. agents pathogènes responsables de la pourriture sèche des tubercules de pomme de terre. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies en Protection des Plantes et Environnement. Tunisie: École supérieure d'Horticulture et d'Élevage de Chott Mariem, 72p.
- Davet, P., Artigues, M., Martin, C.,** (1981). Production en conditions non aseptiques de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. l'INRAT* 74, p.167–186. d'inoculum de *Trichoderma harzianum* rifai pour des essais de lutte biologique. *Agronomie*. 1: 933-936.
- Eilenberg J ., Klingen I., Meadow R., A Hagn ., K Pritsch , M Scholoter ,Jc Munch .,** (2001). Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems , with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* sp . *Genet boil* 298-309p.
- Fravel D., Olivain C. and Alabouvette C.** (2002). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, v. 157, pp. 493-502.
- Gargouri, S.** (2003). Evaluation de l'incidence de la pourriture du pied du blé et de la structure des populations des espèces de *Fusarium* associées à la maladie. Thèse en Biologie végétale, Faculté des sciences de Tunis, Tunis, Tunisie, 94 p. *Ginkgo biloba*. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 19 (2009):1572-1574gnobiotic conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.
- Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., Grizard D., Regnault-Roger C. and Rey P.** (2013). Biological control of plants pathogens: advantages and limitations seen trough the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ Science Pollution Research*, pp. 25-35.
- Godfrey SAC, RD. Monds, DT. Lash, and JW. Marshall.** (2003). Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycol. Res.* n°107, pp. 790-796.

- Gogoi D.K., Mazumder S., Saikia R., Bora T. C.** (2008). Impact of submerged culture conditionson growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. In North-Est India. *Journal de mycology medicale*, 18(2008):1-9.
- Gutierrez, A. ; Florencio, R. ; Ezpeleta, C. ; Cisterna, R. and Martinez, M.** (1995). *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrowtransplant recipient. *Clin. Infect. Dis*, 20 : 1063-1064.
- Harman, G.E., B. Latorre, E. Agosin, R. San Martin, D.G. Riegel, P.A. Nielsen, A. Tronsmo And R.C. Pearson.** (1992). Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control* 7 : 259-266.
- Jourdheuil ,P ., Grison , P., Fraval ,A.,** (2002). la lute biologique : un apercu historique .INRA (Institut national de la recherche Agronomique ) , Laboratoire de Zoologie , le courrier de l’envirannement de l’INRA n<sup>o</sup> 15 .
- Kouassi ,M .**(2001). La lutte biologique : une alternative viable a l’utilisation des pesticides .*Vertig – la revue en science de l’environnement sur le web* , vol NO<sub>2</sub> .(http : [//www.vertigo.uqam.ca/](http://www.vertigo.uqam.ca/))
- Kubicek , C.P. ; Bissett, J. ; Druzhinina, I.; Kullnig-Gradinger, C. ; Szakacs, G.** (2003): Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, 38 (3) : 310-319 .
- Kubicek C.P., Penttilä M.E.,** (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzyme by *Trichoderma*. In *Trichodermaand Glicoladium. Vol 2 Enzymes, biological control and commercial applications*, pp. 49-71. Taylor and Francis Ltd, London
- Kullnig, C M. ; Szakacs, G et Kubicek C.P.** (2000): Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*. p104, 1117-1125.
- Landreau, A.** (2001): Métabolites d’une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes, 201 p.
- Larkin, RP.; Fravel, DR.** (1999): Mechanisms of action and Dose-Response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of Tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **89**, p. 1152–1161.
- Lindsey, D.; Baker, R.** (1967): Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnobiotic conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.
- Markuz, A.** (2012): Influence of chickpea *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysprum* f.sp.ciceris ) on Desi and Kabuli –type of chichepea in integureate disease management option at wilt sick plot in North western Ethiopia .*International journal of curent Research* . 99 :108-113.

- Martin, J.F.; Liras, P.** (1989): Organisation and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics.
- Mcquilke, M.P.** (1990): Development of *Pythium oligandrum* Drechsler for biological control of fungal soil-borne diseases. Thèse, Philosophie, University of Sheffield, 307 p.
- Meriem, M.** 2010 : Développement et extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs. Mémoire, Biotechnologie des mycètes, Université Mentouri Constantine, Algérie, 80 p.
- Miller, S.L.** (1994): Functional diversity in fungi. *Can. J. Bot*, 73 (Suppl. 1) : S50- S57.
- Mokhtaria, T.** (2010) : Contribution à l'étude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.)causé par *Fusariumoxysporum*Schelcht.emend.Suyd.et *Hans.F.sp.ciceri* (padwick) : caractérisation, lutte biologique et comportement variétal.Mémoire de magister.Université d'Oran.257 :123-231.
- Munoz, F.M. ; Demmler, G.J. ; Travis, W.R. ; Ogden, A.K. ; Rossmann, S.M. and Rinaldi, M.G.** 1997 :**Roquebert, M.F.** (1996) : Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Comptendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.
- Nel, B.; Steinberg, C.; Labuschagne, N. and Viljoen A.** (2006): The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology*, v.55, pp. 217-223.
- Papavizas, G.C.** (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23 : 23-54 .pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell*. 16:2499-2513.
- Pauvert, P.** (1984) : Les fusarioses des céréales. *Phytoma*, 202: 15-16.
- Picard, K.; Tririlly, Y. and Benhamou N.** 2000: Cytological Effects of Cellulases in the Parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n°10, pp. 4305-4314.
- Pivkin, M. V.** (2000): Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.*, 198 (1) : 101-109.
- Poddar,R.; Singh,D.; Dubey,S.**(2004): Integrated application of *trichodermaharzianum* mutants and carbendazim to manage chickpea wilt (*Fusariumoxysporumf.sp.ciceri*).*Indian J.Agric.* 74:346348.
- production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* 147, 2447-2459.
- Qin, j.C. ; Zhang, y.M. ; Gaoj,M. ; Bai m,S. ; Yangs,X.; Laatsch, h. ; Zhang, A.L.** (2009):Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum* endophytic fungus isolates from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 19 (2009):1572-1574.



- Ragnaud, J.M. ; Marceau, C.; Roche-Bezian, M.C. ;Wone, C.**(1984) :Infection péritonéale à *Trichoderma koningii* sur dialyse péritonéale continue ambulatoire. *Med. Maladies Infect*, N°7-8 : 402-405.
- Rey, P.; Gl, F.; Benhamou, N.; Tirilly, Y. Lnpv** (2008): *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: Ait Barka E, Clément C (eds) *Plant–microbe interactions*. Research Signpost, Kerala, pp 43–67.
- Rifai, T.** (2004) : Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* .Paris.pp55-56-58.
- Rippa , S.** (2007) : Interactions peptaïbols/plantes : étude de l'effet de l'alaméthicine, toxine ou éliciteur de réactions de défense, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Thèse, Stratégies d'exploitation des fonctions biologiques, Université de Compiègne, Compiègne, 172 p.
- Samuels, G. J. ; Petrini, O. ; Manguin, S.** (1994): Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* , 86 : 421-435.
- Sandgren, M. ; Stahlberg, J. & Mitchinson, C.**(2005): Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 2005, 89 : 246-291.
- Saxena, M. C ; Singh, K. B.** (1987)- *The chickpea*. Ed- CAB internat., 399 p.
- Schiffers, B. ; Wainwright, H .** (2011) : la lutte biologique et protection intégrée P20 .
- Seguin, P. ; Degeilh, B. ; Grulois, I. ; Gacouin, A. ; Maugendre, S., DUFOUR, T. ; Dupont, B. ; Camus, C. ,** (1995): Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 14 : 445-448.
- Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.** (1998): Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Glicoladium*. In *Trichodermaand Glicoladium. Basic biology, taxonomy and genetics*, pp. 131-191.Taylor and Francis Ltd, London.
- Subramanian, CV.** (1983): *Hyphomycetes : Taxonomy and Biology*. Academic Press Inc., p. 179, 312, 356, 358-370, 381, 387-391, 398-400, 406-409.
- Tanis, B.C. ; Van Der Pijl, H. ; Van Ogtrop, M.L. ; Kibbelaar, R.E. ; Chang, P.C. .,** (1995) : Fatal fungal peritonitis by *Trichoderma longibrachiatum* complicating peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transpl*, 10 (1) : 114-116.
- Trapero-Casas, A. ; Jimenez-Diaz, M.** (1985): Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain.*Phytopathology* 75:1146-1151.*Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol*, 35 (2) : 499-503.
- Vander Maessen, L. J.C.** (1972): *Cicer L*, a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum L*) , its ecology and cultivation. Meddling land bouw bog school wagenigen, Nederland, 72 p.
- Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y. and Valéro J.R.** (2007): Antagonistic fungi,

- Trichoderma spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, n°37, pp. 1-20.
- vincent ,C. ;coderre ,D.**(1992) : la lutte biologique .Gaetan morin, québec , canada.
- Vining, L.C.** (1990): Fonctions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol., 44 : 395-427.
- Vizcaino, J.A. ; Sanz, L. ; Cardoza, R.E. ; Monte, E. & Gutierrez, S.** (2005) :Detection of putative peptide synthetase genes in Trichoderma species: Application of this method to the cloning of a gene from T. harzianum CECT 2413. FEMS Microb. Lett. , 244 : 139–148.
- Voelker, F.; Altaba, S.** (2001): Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamyc in
- Weindling, R. ; H, Emerson.** (1936): the isolation of toxic substance from the culture filtrates of Trichoderma. Phytopathology, 26: 1068-1070.
- Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I.** (1999): Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (Cucumis sativus L.) by the Biocontrol Agent Trichoderma harzianum. Appl. Environ. Microbiol., 65: 1061-1070.
- Zaim, S.** (2007) : Contribution à l'étude de trichoderma sp. Agent antagoniste de Fusarium oxysporum f. s. ciceri et Fusarium oxysporum f. sp. Lentis, agents du flétrissement vasculaire du pois chiche et de la lentille. Mémoire de magister, université de Mascara., 113:59 -56.
- Zhang, C.; Druzhinina, I.S.; Kubicek C.P and Xu T.** (2005): Trichoderma biodiversity in China evidence for a North to South distribution of species in East Asia. FEMS Microbial. Lett, 251(2).p.251-257.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> . Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma</i> .....	5
<b>Figure 02</b> . Cycle biologique de <i>Trichoderma</i> sp .....	6
<b>Figure 03</b> . Confrontation par contact direct entre <i>Trichoderma</i> sp et FOC.....	13
<b>Figure 04</b> . Confrontation à distance entre <i>Trichoderma</i> sp et FOC sur milieu PDA.....	13
<b>Figure 05</b> . Fermentation et extraction des métabolites secondaires des isolats fongique.....	18
<b>Figure 06</b> . La Confrontation par contact direct de <i>T.lutea crystallina</i> ,, <i>T.subeffusa</i> et <i>T.koningii</i> , <i>T. neoforum</i> , <i>T. lutea</i> et <i>T. harasium</i> vis-vis FOC avec le témoin.....	21
<b>Figure 07</b> . Présentation des résultats de test de confrontation direct entre <i>T. koningii</i> , <i>T.lutea</i> , <i>T.lutea</i> <i>crystallina</i> , <i>T.subeffusa</i> , <i>T. neoforum</i> , <i>T. harasium</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> .....	22
<b>Figure 08</b> . La Confrontation par contact direct de <i>T.lutea crystallina</i> ,, <i>T.subeffusa</i> et <i>T. harasium</i> , <i>T.</i> <i>neoforum</i> , <i>T. lutea</i> et <i>T. koningii</i> vis-vis FOC avec le témoin.....	23
<b>Figure 09</b> . Présentation des résultats de test de confrontation indirect entre <i>T. koningii</i> , <i>T. lutea</i> , <i>T.lutea</i> <i>crystallina</i> , <i>T.subeffusa</i> , <i>T. neoforum</i> , <i>T. harasium</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
<b>Figure 10</b> .Résultats de témoin inoculé par le FOC.....	25
<b>Figure 11</b> . Résultats de l'effet protectif <i>T. subeffusa</i> et <i>T.lutea crystallina</i> chez la variété GHAB04 .....	25
<b>Figure 12</b> . Résultats de l'effet protectif <i>T.lutea</i> et <i>T.harasium</i> chez la variété GHAB04.....	25
<b>Figure 13</b> .Résultats de l'effet protectif <i>T. koningii</i> et <i>T. neoforum</i> chez la variété GHAB04.....	26
<b>Figure 14</b> . Résultats de l'évaluation de l'activité antagoniste in vivo de <i>T. koningii</i> , <i>T. lutea</i> , <i>T.lutea</i> <i>crystallina</i> , <i>T.subeffusa</i> , <i>T. neoforum</i> , <i>T. harasium</i> .....	26
<b>Figure 15</b> . Le poids sec de la biomasse issue des milieux de fermentations de <i>T. harzianum</i> et <i>T. Koningii</i> . .....	27
<b>Figure 16</b> . Effet de l'extrait brut de <i>T. harzianum</i> sur la croissance mycélienne du FOC.....	29
<b>Figure 17</b> . Effet de l'extrait brut de <i>T. koningii</i> sur la croissance mycélienne du FOC.....	29
<b>Figure 18</b> . L'effet de l'extrait brut de <i>T. harzianum</i> et <i>T. koningii</i> sur la croissance mycélienne du FOC...	29

## Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique.</b>	
1. Historique et taxonomie de Trichoderma sp.....	3
1.1 Historique de Trichoderma sp.....	3
1.2 Taxonomie de Trichoderma sp .....	4
1.3 Ecologie.....	4
1.4 Morphologie de Trichoderma sp.....	5
1.5 Biologie Trichoderma sp .....	6
1.6 Le cycle de Trichoderma sp .....	7
2. Métabolites secondaires.....	7
2.1 Production de métabolites intéressants .....	8
2.2 Production d'enzymes.....	8
2.3 Production de substances bioactives.....	8
3. Mode d'actions Trichoderma sp.....	9
3.1. Compétition nutritive et spatiale .....	9
3.2. Mycoparasitisme.....	9
3.3. Antibiose.....	9
3.4. Stimulation des mécanismes de défense des plantes .....	10
3.5. Stimulation de la croissance des plantes .....	10
5. La lutte biologique et Le biocontrôle .....	11
5.1. Définition et objectifs de la lutte biologique.....	12
5.2. Importance de la lutte biologique.....	12
<b>Chapitre II : Matériel et méthode</b>	
I. Matériel utilisés.....	13
A. Matériel biologique .....	13
B. Matériel fongique .....	13
2.1. L'agent pathogène .....	13
1. l'évaluation de l'activité antagoniste in vitro du Trichoderma sp contre le FOC.....	13
Confrontation par contact direct sur milieu de culture.....	14
Confrontation à distance sur milieu de culture.....	15
1.1. Mesure de la croissance mycélienne .....	15

2. l'évaluation de l'activité antagoniste in vivo .....	16
2.1. Préparation de l'inoculum .....	16
2.2. Méthode d'inoculation .....	16
2.3. Exploitation des résultats et analyses statistiques .....	16
2.4. Mesure de l'incidence.....	16
2.5. Mesure de la sévérité d'attaque .....	16
2.6. Calcul de l'Indice de flétrissement (DII).....	17
2.7. Calcul de l'AUDPC .....	17
2.8. Analyse statistique .....	18
3. La fermentation fongique en milieu liquide .....	18
3.1. Le milieu de culture.....	18
3.2. Procédure d'extraction .....	18
3.3. Détermination de la biomasse par poids sec .....	21
L'application des métabolites secondaires (extraits brutes) .....	21
L'application in vitro .....	21
<b>Chapitre III : Résultat et Discussion</b>	
1. L'évaluation de l'activité antagoniste in vitro du Trichoderma sp contre le FOC.....	22
1.1. Confrontation par contact direct .....	22
1.2. Confrontation à distance .....	24
2. L'évaluation de l'activité antagoniste in vivo .....	26
3. Effet de l'extrait brut sur la croissance mycélienne .....	29
Détermination de la biomasse par poids sec.....	29
Discussion .....	33
Conclusion .....	37
Références bibliographiques .....	39
Annexe	
Résumé	

## Résumé

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, en particulier l'impact sur l'homme et l'environnement. Plusieurs mycètes peuvent, par contre, avoir un effet bénéfique dans le contrôle des phytopathogènes et minimiser la nuisibilité des pesticides en particulier les *Trichoderma* connus par leur pouvoir antagoniste contre les phytopathogènes. L'objectif de notre travail est de tester l'effet antagoniste et l'analyse de l'efficacité des métabolites secondaires de quelques souches de *Trichoderma* sp. six isolats de *Trichoderma* ont été choisis pour réaliser ce travail à savoir de *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. luttea*, *T. lutea crystallina*, *T. neoforum*, *T. subeffusa*. Les résultats de l'antagonisme ont montré l'efficacité de toutes les espèces testées. Les taux d'inhibition contre le FOC varient entre 80, 43% et 80.14% pour la confrontation directe et entre 44,39 et 50,01% pour le test indirect. Cependant, l'espèce *Trichoderma harzianum* a constatée la plus efficace. Deux espèces *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* ont été sélectionnées pour effectuer l'extraction des métabolites secondaires. La souche de *Trichoderma harzianum* a produite une masse importante des métabolites secondaires, avérés les plus efficaces avec des moyennes d'inhibition de FOC environ 59,90, 43,4 et 43% pour la concentration 50000, 25000 et 1000 ppm respectivement. Cependant, l'application in vivo des métabolites secondaires a montré leurs efficacité vis-à-vis le FOC, où La souches *Trichoderma harzianum* jugé le plus efficace, dont les valeurs moyennes de l'AUDPC calculées est de 284,37 exprime une réduction de 68,3% de la gravité de la maladie.

**Mots-clés:** *Trichoderma* sp, Lutte biologique, Antagoniste, métabolites secondaires, Extraction.

## ملخص

بدأ ظهور مكافحة البيولوجية بعد فشل المكافحة الكيميائية، وخاصة لتأثيرها على البشر والبيئة. يمكن للعديد من الفطريات ان يكون لها تأثير مفيد في السيطرة على مسببات الأمراض النباتية والتقليل من أضرار المبيدات ولا سيما الترايكوديرما التي تعرف بقوتها العدائية ضد مسببات الأمراض النباتية. والهدف من عملنا هو اختبار التأثير المضاد لها وتحليل فعالية المركبات الثانوية لبعض سلالات الترايكوديرما. وقد تم اختيار ستة عينات من الترايكوديرما لهذا العمل وهي ..... وأظهرت النتائج فعالية جميع الأنواع التي تم اختبارها. معدل تثبيط ضد الفيزاريوم تختلف بين 80.43% و 80.14% للاختبار المباشر وبين 44.39 و 01، 50% للاختبار غير مباشر. بينما نجد ان تريكودارما ارازانيوم هي السلالة الاكثر فعالية وقد تم اختيار اثنين من السلالات تريكودارما ارازانيوم و تريكودارما كونينجي بهدف استخلاص مركباتها توسط الأيضية الثانوية حيث لاحظنا ان تريكودارما ارازانيوم انتجت كمية معتبرة من المركبات الايضية الثانوية اكدت النتائج انها اكثر فعالية في تثبيط الفيزاريوم حوالي 59.90، 43.4 و 43% للتركيز 50000، 25000 و 1000 جزء في المليون على التوالي. بينما اثبتت التجارب الحية للمركبات الايضية الثانوية فعاليتها على الفيزاريوم حيث ان تريكودارما ارازانيوم اعتبرت الاكثر فعالية حيث ان القيمة المتوسطة لنسبة المرض المحسوبة هي 284,37 ترجمت نقص يقدر ب 68.3 لحدة المرض. كلمات البحث: الترايكوديرما، المكافحة البيولوجية، خصم، واستخراج الأيض الثانوية

## Abstract

Biological control is born of a failure of chemical control, particularly the impact on humans and the environment. Several fungi can, for cons, have a beneficial effect in the control of plant pathogens and minimize the harmfulness of pesticides in particular *Trichoderma* known by their antagonistic power against plant pathogens. The aim of our work is to test the antagonist effect and analysis of the effectiveness of secondary metabolites of some strains of *Trichoderma* sp. six *Trichoderma* isolates were chosen for this work namely *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *T. luttea*, *T. lutea crystallina*, *neoforum* *T. subeffusa*. The results of the antagonism showed the effectiveness of all species tested. The inhibition rate against the FOC vary between 80, 43% and 80.14% for the direct confrontation and between 44.39 and 50.01% for the indirect test. However, the species *Trichoderma harzianum* has proven most effective. Two species *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*. were selected to carry out the extraction of secondary metabolites. The strain of *Trichoderma harzianum* has produced a large body of secondary metabolites, proved most effective with average inhibition FOC about 59.90, 43.4 and 43% for the concentration 50000, 25000 and 1000 ppm respectively. However, the in vivo application of secondary metabolites showed their vis-à-vis the effectiveness FOC, where the *Trichoderma harzianum* strains considered most effective, with average values calculated AUDPC is 284.37 expresses reduced 68, 3% da severity of the disease.

Keywords: *Trichoderma* sp, Biological control, Antagonist, secondary metabolites extraction.

## Liste des abréviations

FOC: Fusarium oxysporum f.sp.Ciceri.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PDB: Bouillon de pomme de terre dextrose.

T:Trichoderma.

sp : espèce.

Ppm : Partie par million.

mm: Millimètre.

% : Pourcentage.

ml: Millilitre.

C°:Degré Celsius.

T:Témoin.

MSFB : métabolites secondaires fongiques bruts

AcEt : acétate d'éthyle

ZI : Zone d'inhibition

ITGC : l'Institut Technique des Grandes Cultures .

I : Indice.

S : Sévérité.

ISM : l'incidence moyenne de gravité.

DII : L'index de l'intensité de la maladie.

l'AUDPC: Area Under the Disease Progress Curve

l'OILB : Utilisation d'organismes Vivants Biopesticides

ITGC: l'Institut Technique des Grandes Cultures

GC : pourcentage de GC, ou coefficient de Chargaff bases nucléiques cytosine et guanine

# Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier mon dieu Allah qui ma donné la volonté et le courage pour la réalisation de se travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je remercie également mon encadreur Madame Maadi Oula, pour le privilège qu'elle m'a fait en acceptant de diriger ce travail. Sa gentillesse, Sa modestie, sa riche expérience et l'accueil cordial qu'elle m'a toujours réservé m'ont inspiré une grande admiration A son égard.

Nos sincères gratitude vont à Madame BELKASMI Farida qui a accepté de présider notre jury.

Mes remerciements s'adressent également à mon encadrant Monsieur Djamel Moutassem, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, sa clairvoyance et ses compétences m'ont été d'une aide inestimable.

Je désir aussi remercier les ingénieurs de laboratoire, qui m'ont fourni les outils nécessaires à la réussite de mes études universitaires. Je tiens à remercier spécialement Khalil et Fouad.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à tous mes camarades pour leurs encouragements et pour l'ambiance agréable tout au long de ce travail.



# DEDICACE

*Je remercie Dieu le Généreux pour m'avoir guidé vers la  
Lumière de la recherche, du savoir et de science.*

*Je dédie affectueusement ce mémoire:*

*A mon père pour son immense aide et ses conseils*

*Ma très chère mère pour ses prières pour avoir la force et volonté  
Pour terminer ce document*

*Mon fiancé **Khaled** Qui m'a encouragé tout au Long de  
Mes études.*

*Ma sœur : **Sara***

*Mes chers frères : **Moutassem et Mouhamed** .*

*Ma Grand-Mère et grand-père qui j'aime beaucoup .*

*Mes Tantes : **Salima et Houria***

*Mon oncle: **Tayeb***

*Mon trésor: **Ayob et Loai***

*Ma belle grande famille*

*La meilleure cousine Dans le monde **Chaima***

*Mes fidèles amies: **Madjda Houda Selma Radia Hanane Ikram  
Fayza***

*A tous mes amis de la promotion Biologie 2016.*

*Et tout qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail; de près  
ou de loin.*

*Surtout notre encadreur **Mmd :Maafi .O***

*Et notre Co-encadreur **Ms :Daho .M***

*Toutes la famille **Belhadj***

**BELHADJ HADJER**

# DEDICACE

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie cette thèse de master 2 à :

*A Ma tendre Mère **DJAMILA**: Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A Mon très cher Père **SALEH**: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A mes frères : **AKREM, ABDOU***

*A mes chères sœurs : **HADJER, MERIEM, et .MAROUA.***

*A mes fidèles amis : **SAMIA ,LEILA , SABRINA ET IMENE***

*A TOUTE LA FAMILLE : **HADDAD ET BOUSSAM***

*A docteur **DAHO** et Mdm maafi Cette humble dédicace ne saurait exprimer nom grand respect et ma profond estime, que dieu vous procure bonne santé et long vie.*

*A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.*

*A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.*

*Haddad Selma*

## DEDICACE

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*À mes parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*À ma mère, Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*À mon père aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*À mes chères frères Mohamed et Youssef Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*À ma très chère sœur Meriem, son mari Raouf et leurs filles, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*À mes chères amies Rahma, Hadjer, Selma, Imen, Aya, Fayza Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amis sur qui je peux compter.*

*Belabbassi Houda*

Annexe

**Annexe 01 : Analyse de la variance de taux d'inhibition test direct**

**Descriptives**

Zone I DIRECT

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
Lutea crystalina	3	77,8733	7,86928	4,54333	58,3249	97,4217	73,33	86,96
Lutea	3	72,1100	8,94574	5,16483	49,8875	94,3325	65,22	82,22
Subeffusa	3	74,2667	3,34927	1,93370	65,9466	82,5867	71,11	77,78
Neoforum	3	69,8733	4,93794	2,85092	57,6068	82,1399	66,67	75,56
Harzianum	3	80,1433	,24826	,14333	79,5266	80,7600	80,00	80,43
Koningii	3	80,1449	,25102	,14493	79,5214	80,7685	80,00	80,43
Total	18	75,7353	6,11018	1,44018	72,6967	78,7738	65,22	86,96

**ANOVA à 1 facteur**

ZONE I

	Somme des carrés	Ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	279,327	5	55,865	1,887	,171
Intra-groupes	355,355	12	29,613		
Total	634,682	17			

## Annexe 02: Analyse de la variance de taux d'inhibition test indirect

Zone I indirect

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
Lutea crystalina	3	28,3892	2,80357	1,61864	21,4247	35,3536	26,32	31,58
Lutea	3	38,5517	1,70290	,98317	34,3215	42,7820	36,59	39,53
Subeffusa	3	38,8158	2,86770	1,65567	31,6920	45,9395	36,84	42,11
Neoforum	3	31,4693	5,26658	3,04066	18,3864	44,5522	26,32	36,84
Harzianum	3	44,3963	11,92445	6,88458	14,7743	74,0183	35,29	57,89
Koningii	3	50,0516	25,18483	14,54047	-12,5110	112,6142	26,32	76,47
Total	18	38,6123	12,38133	2,91831	32,4552	44,7694	26,32	76,47

### ANOVA à 1 facteur

Zone I indirect

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	959,677	5	191,935	1,399	,292
Intra-groupes	1646,377	12	137,198		
Total	2606,054	17			

### Annexe 3: Analyse de la variance de taux d'inhibition test antifongique

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
Harzianum	20	38,0256	15,19913	3,39863	30,9122	45,1391	16,25	60,90
Koningii	20	27,6731	18,23835	4,07822	19,1373	36,2089	3,21	53,85
Total	40	32,8494	17,38045	2,74809	27,2908	38,4079	3,21	60,90

Concentrations	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
5000 ppm	8	56,1398	4,12444	1,45821	52,6917	59,5879	51,25	60,90
2500 ppm	8	42,2256	1,88913	,66791	40,6462	43,8049	39,38	44,87
1000 ppm	8	35,6931	8,04093	2,84290	28,9707	42,4155	26,92	44,87
500 ppm	8	19,3409	7,28629	2,57609	13,2495	25,4324	11,25	26,92
100 ppm	8	10,8474	7,29725	2,57997	4,7467	16,9480	3,21	18,75
Total	40	32,8494	17,38045	2,74809	27,2908	38,4079	3,21	60,90

ANOVA à 1 facteur les concentrations

ANOVA à 1 facteur antifongique

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	10440,090	4	2610,022	68,120	,000
Intra-groupes	1341,034	35	38,315		
Total	11781,123	39			

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1071,756	1	1071,756	3,803	,059
Intra-groupes	10709,367	38	281,825		
Total	11781,123	39			

## Annexe 4: Analyse de la variance de taux d'inhibition de l'activité antagoniste in vivo

AUDPC	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
Lutea crystalina	3	1020,3125	40,41412	23,33310	919,9183	1120,7067	984,38	1064,06
Lutea	3	953,1250	35,80137	20,66993	864,1895	1042,0605	914,06	984,38
Subeffusa	3	300,7813	78,58847	45,37307	105,5567	496,0058	220,31	377,34
Neoforum	3	454,6875	146,81681	84,76472	89,9743	819,4007	356,25	623,44
Harzianum	3	284,3750	68,30467	39,43572	114,6968	454,0532	220,31	356,25
Koningii	3	334,3750	112,63013	65,02704	54,5862	614,1638	225,00	450,00
Total	18	557,9427	326,36193	76,92424	395,6467	720,2387	220,31	1064,06

AUDP

ANOVA à 1 facteur

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1714710,999	5	342942,200	42,870	,000
Intra-groupes	95994,873	12	7999,573		
Total	1810705,872	17			

## Annexe 05 : Comparaisons multiples

Variable  
dépendante: AUDPC

(I) Espèces	Différence de moyennes (I-J)	Erreur standard	Signification	Intervalle de confiance à 95%			
				Borne inférieure	Borne supérieure		
LSD	Lutea crystalina	Lutea	67,18750	73,02772	,376	-91,9262	226,3012
		subeffusa	719,53125 <sup>*</sup>	73,02772	,000	560,4175	878,6450
		Neoforum	565,62500 <sup>*</sup>	73,02772	,000	406,5113	724,7387
		Harzianum	735,93750 <sup>*</sup>	73,02772	,000	576,8238	895,0512
		Koningii	685,93750 <sup>*</sup>	73,02772	,000	526,8238	845,0512
	Lutea	Lutea crystalina	-67,18750	73,02772	,376	-226,3012	91,9262
		subeffusa	652,34375 <sup>*</sup>	73,02772	,000	493,2300	811,4575
		Neoforum	498,43750 <sup>*</sup>	73,02772	,000	339,3238	657,5512
		Harzianum	668,75000 <sup>*</sup>	73,02772	,000	509,6363	827,8637
		Koningii	618,75000 <sup>*</sup>	73,02772	,000	459,6363	777,8637
	subeffusa	Lutea crystalina	-719,53125 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-878,6450	-560,4175
		Lutea	-652,34375 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-811,4575	-493,2300
		Neoforum	-153,90625	73,02772	,057	-313,0200	5,2075
		Harzianum	16,40625	73,02772	,826	-142,7075	175,5200
		Koningii	-33,59375	73,02772	,654	-192,7075	125,5200
	Neoforum	Lutea crystalina	-565,62500 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-724,7387	-406,5113
		Lutea	-498,43750 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-657,5512	-339,3238
		subeffusa	153,90625	73,02772	,057	-5,2075	313,0200
		Harzianum	170,31250 <sup>*</sup>	73,02772	,038	11,1988	329,4262
		Koningii	120,31250	73,02772	,125	-38,8012	279,4262
	Harzianum	Lutea crystalina	-735,93750 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-895,0512	-576,8238
		Lutea	-668,75000 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-827,8637	-509,6363
		subeffusa	-16,40625	73,02772	,826	-175,5200	142,7075
		Neoforum	-170,31250 <sup>*</sup>	73,02772	,038	-329,4262	-11,1988
		Koningii	-50,00000	73,02772	,507	-209,1137	109,1137
	Koningii	Lutea crystalina	-685,93750 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-845,0512	-526,8238
		Lutea	-618,75000 <sup>*</sup>	73,02772	,000	-777,8637	-459,6363
		subeffusa	33,59375	73,02772	,654	-125,5200	192,7075
Neoforum		-120,31250	73,02772	,125	-279,4262	38,8012	
Harzianum		50,00000	73,02772	,507	-109,1137	209,1137	
Tamhane	Lutea crystalina	Lutea	67,18750	31,17178	,789	-129,0650	263,4400
		subeffusa	719,53125 <sup>*</sup>	51,02107	,012	283,4323	1155,6302
		Neoforum	565,62500	87,91753	,218	-565,2881	1696,5381
		Harzianum	735,93750 <sup>*</sup>	45,82149	,005	382,7760	1089,0990
		Koningii	685,93750	69,08653	,065	-79,6849	1451,5599
	Lutea	Lutea crystalina	-67,18750	31,17178	,789	-263,4400	129,0650
		subeffusa	652,34375 <sup>*</sup>	49,85942	,020	185,3054	1119,3821



	Neoforum	498,43750	87,24852	,290	-685,1853	1682,0603
	Harzianum	668,75000*	44,52440	,009	293,6145	1043,8855
	Koningii	618,75000	68,23314	,093	-195,2788	1432,7788
subeffusa	Lutea crystalina	-719,53125*	51,02107	,012	-1155,6302	-283,4323
	Lutea	-652,34375*	49,85942	,020	-1119,3821	-185,3054
	Neoforum	-153,90625	96,14455	,969	-951,2636	643,4511
	Harzianum	16,40625	60,11565	1,000	-363,7426	396,5551
	Koningii	-33,59375	79,29206	1,000	-583,0549	515,8674
Neoforum	Lutea crystalina	-565,62500	87,91753	,218	-1696,5381	565,2881
	Lutea	-498,43750	87,24852	,290	-1682,0603	685,1853
	subeffusa	153,90625	96,14455	,969	-643,4511	951,2636
	Harzianum	170,31250	93,48922	,941	-691,6928	1032,3178
	Koningii	120,31250	106,83433	,997	-585,2725	825,8975
Harzianum	Lutea crystalina	-735,93750*	45,82149	,005	-1089,0990	-382,7760
	Lutea	-668,75000*	44,52440	,009	-1043,8855	-293,6145
	subeffusa	-16,40625	60,11565	1,000	-396,5551	363,7426
	Neoforum	-170,31250	93,48922	,941	-1032,3178	691,6928
	Koningii	-50,00000	76,05058	1,000	-626,0982	526,0982
Koningii	Lutea crystalina	-685,93750	69,08653	,065	-1451,5599	79,6849
	Lutea	-618,75000	68,23314	,093	-1432,7788	195,2788
	subeffusa	33,59375	79,29206	1,000	-515,8674	583,0549
	Neoforum	-120,31250	106,83433	,997	-825,8975	585,2725
	Harzianum	50,00000	76,05058	1,000	-526,0982	626,0982

\*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

### **1 les milieux de culture utilisée :**

#### **1 1 Potato Dextrose Agar (PDA)**

- 200g pomme de terre
- 20 Glucose
- 20g Agar Agar
- 1000ml L'eau distillé.

Le Milieu est stérilisé à l'autoclave 30min à 120°C.

#### **1 2 Potato dextrose broth (PDB)**

- Pomme de terre épluchées et coupées 200 g
- Glucose 20 g
- Eau distillée 1000 ml