



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 بوعريش
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الارض و الكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم الفلاحية
Département des Sciences Agronomiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Agronomiques

Spécialité : Protection des végétaux

Thème

Efficacité des huiles essentielles des plantes aromatiques (*Thymus pallescens* de Noé. et *Cymbopogon citratus* Stapf.) et les agents biologiques (*Trichoderma* sp) dans le contrôle intégré de flétrissement fusarien du pois chiche.

Présenté par : BOURAHLI Nesrine & TRAKA Aicha

Devant le jury :

Président : Mr T. SAYAH.....MAA (Université de BBA)

Encadrant : Mr D. MOUTASSEM.....MCB (Université de BBA)

Examineur: Mr D. ALILI.....MCB (Université de BBA)

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

En premier lieu et avant tout nous tenons à remercier DIEU le tout-puissant, le clément, le miséricordieux qui nous a donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail.

*Nous tenons à remercier vivement notre cher encadreur **Mr. MOUJASSEM DAHOV**, qui a fourni des efforts énormes, par ses informations, ses conseils judicieux, ses critiques constructives et sa patience ainsi que son suivie tout au long de notre travail.*

Nous sommes sans voix face à sa disponibilité, sa gentillesse, son soutien et le fait qu'il nous ait fait profiter de son expérience et prodiguer de ses précieux conseils.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre gratitude à tous les membres du jury pour avoir évalué ce travail,

*Nous tenons tout d'abord à remercier sincèrement **Mr SAYAH T.** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury,*

*Nos remerciements sincères et respectueux également à **Mr ALILI D.** qui a accepté de faire part de ce jury, d'examiner et juger notre travail,*

Nous vous adressons notre gratitude pour votre gentillesse, et tous précieux conseils.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous nos enseignants du département de Protection des végétaux de l'université El Bachir El Ibrahimi – Bordj Bou Arreridj, qui ont assuré notre formation durant ces cinq dernières années.

Afin, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles respectives ainsi que nos proches et nos amis pour le soutien infailible qu'ils nous ont apporté tout au long de nos études, et à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette mémoire

Dédicace

Je dédie ce travail:

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force et la lumière de mes jours pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Mon héros, l'homme de ma vie qui s'est toujours sacrifié pour m'aider et m'encourager à avancer dans la vie, ma source d'amour et de force, merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver pour moi et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon adorable petite sœur Houda, ma meilleure qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille. Les mots ne peuvent pas exprimer mes infini sentiment d'amour à toi, uedieu te protège pour moi je souhaite un avenir radieux plein de réussite et bonheur.

A mes très chers frères Abd El Djalil et Anoir Montassir, puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite

Ma meilleure amie, Rawya merci beaucoup d'être dans ma vie, et de supporté dans les moments difficiles. je souhaite que l'amitié que nous a réuni persiste pour toujours

Mabinôme Aicha traka, et a tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

*A tous ceux que j'aime.
Merci !*

Bourahli Nesrine

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quelque soient les termes employés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A mon très chère père que dieu ait miséricorde sur lui, pour les encouragements, tendresse, l'affection et le soutien durant mes études.

À ma très chère mère qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse.

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. 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.

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.

A mon fiancé SEDRATI Ali tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A ma collègue Nesrine avec laquelle j'ai partagé ce travail et avec elle j'ai passé des moments inoubliables.

Je ne peux pas oublier de remercier chaleureusement mes très chères copines: Rayane, Samira, Nesrine, Chaza, Yamina, pour l'ambiance cordiale et l'aide qu'ils m'ont apportés à tout Moment.

A tous ceux qui me sont chères. A tous ceux qui m'aiment. A tous ceux que j'aime.

A vous tous merci.

Traka Aicha.

Résumé

Effacité des huiles essentielles des plantes aromatiques (*Thymus pallescens* de Noé. et *Cymbopogon citratus* Stapf.) et les agents biologiques (*Trichoderma* sp) dans le contrôle intégré de flétrissement fusarien de pois chiche.

L'objectif de la recherche est d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *T. pallescens* de Noé et *C. citratus* Staf, ainsi que les agents de lutte biologique *Trichoderma* en traitements individuels et associés afin d'envisager une lutte biologique intégrée et d'évaluer leur activité antifongique vis-à-vis le FOC. Les essais des tests in vitro montre que les huiles essentielles ont exercé une importante activité inhibitrice de la sporulation et la germination des spores contre le Foc. Les deux huiles essentielles *T. pallescens* et *C. citratus* ont montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores avec les concentrations 15 et 10 µL/mL. L'effet de l'ensemble des souches de *Trichoderma* ont été testées par la technique de confrontation directe et indirecte. Les zones d'inhibitions dont les valeurs faibles sont notées chez *Trichoderma* spp3 et la plus élevée a été notée chez *Trichoderma* spp2 ont marqués environ 83.18 et 88.97%, respectivement. Les résultats obtenus in vivo montrent que les valeurs de l'AUDPC enregistrées chez les plantules de pois chiche traitées par l'huile essentielle de *T. pallescens* ont variables entre 71.67 et 341.6 expliquent une diminution de la gravité de la maladie entre 77.12 % et 95.2%. Cependant, les valeurs notées chez les plantules traitées avec l'huile essentielle de *C. citratus* ont plus au moins supérieures, et sont variables entre 71.67 et 341.6, montrent une diminution de la gravité de la maladie variable entre 77.12 % et 95.2%. Par ailleurs, une diminution très remarquable de la sévérité de la maladie dans les traitements associés en comparaison avec les traitements individuels, où la valeur la plus faible a été observée chez la combinaison *Trichoderma* spp2/ *T. pallescens* qui présente une diminution de l'ordre de 95.56%

Mots-clés : *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, Pois chiche, *Trichoderma* spp, Huile essentielle, *T. pallescens*, *C. citratus*, Traitements combinés.

الملخص

فعالية الزيوت العطرية للنباتات العطرية (*Thymus pallescens* من Noé و *Cymbopogon citratus* Staf) والعوامل البيولوجية (*Trichoderma* sp) في مكافحة المتكاملة للذبول الفيوزاريوم وتحسين مقاومة نبات الحمص.

الهدف من البحث هو تقييم فعالية الزيوت الأساسية من اثنتين من النباتات العطرية *T. pallescens* من Noé و *C. citratus* Staf ، بالإضافة إلى عوامل مكافحة البيولوجية في *Trichoderma* في العلاجات الفردية والعلاجات المرتبطة من اجل اعتبار بيولوجي متكامل السيطرة وتقييم نشاطها المضاد للفطريات الممرضة Foc. أظهرت الاختبارات المخبر أن الزيوت الأساسية مارست نشاطا مثبطا كبيرا للتكاثر و إنبات الجراثيم . و أظهرت أن الزيوت الأساسية *T. pallescens* و *C. citratus* تثبيطا كاملا في نمو الفطريات بتركيزات 15/10 ميكرو لتر/مل. تم اختبار تأثير جميع سلالات *Trichoderma* بتقنية المواجهة المباشرة وغير المباشرة. مناطق المثبطات التي لوحظت قيمها المنخفضة في *Trichoderma* spp1 و الأعلى لوحظت في *Trichoderma* spp2 تم تمييزها تقريبا 18.83 % و 97.88 % على التوالي. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها في التجارب الحية قيم AUDPC في شتلات الحمص المعالج بالزيت الأساسي *T. pallescens* تفاوتت بين 67.71 و 6.341 مع نسبة انخفاض في شدة المرض بين 12.77 % و 2.95 % . بالإضافة إلى ذلك هناك انخفاض ملحوظ للغاية في شدة المرض في العلاجات المركبة مقارنة بالعلاجات الفردية حيث لوحظت اقل قيمة في تركيبة *T. pallescens* / *spp2* و التي تظهر انخفاضا بنسبة 69.95 %.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* ، الحمص ، الزيوت الأساسية *Cymbopogon citratus* ، *Thymus pallescens* ، العلاجات المركبة.

Abstract

Efficacy of essential oils of aromatic plants (*Thymus pallescens* and *Cymbopogon citratus* Stapf.) and biological agents (*Trichoderma* sp) in the integrated control of Fusarium wilt of chickpea.

The objective of the research is to evaluate the effectiveness of the essential oils of two aromatic plants *T. pallescens* and *C. citratus* Staf, as well as the biological control agents *Trichoderma* in individual and associated treatments in order to consider an integrated biological control and to evaluate their antifungal activity against Foc. The tests of in vitro tests show that the essential oils used an important activity inhibiting the sporulation and the germination of spores against the Foc. Essential oils of *T. pallescens* and *C. citratus* showed complete inhibition of mycelial growth with concentrations 15.10 µL / mL. The effect of all *Trichoderma* strains were tested by the technique of direct and indirect confrontation. The zones of inhibitions whose low values are noted in *Trichoderma* spp1 and the highest was noted in *Trichoderma* spp2 marked approximately 83.18 and 88.97%, respectively. The results obtained in vivo show the values of AUDPC noted in chickpea seedlings treated with the essential oil of *T. pallescens* vary between 71.67 and 341.6 explain a decrease in the severity of the disease between 77.12% and 95.2%. In addition, a very significant decrease of the disease severity in the combined treatments in comparison with the individual treatments, where the lowest value was observed in the *Trichoderma* spp2 / *T. pallescens* combination which shows a decrease in the order of 95.69%.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, Chickpea, *Trichoderma* spp, Essential oil, *T. pallescens*, *C. citratus*, Combination treatments.

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Remerciements	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1

CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériels biologiques utilisés.....	3
1.1.1. Matériels végétales.....	3
1.1.2. Matériels fongiques.....	3
1.2. Effet des huiles essentielles sur le Foc <i>in vitro</i>	4
1.2.1. Extraction et formulation des huiles essentielles.....	4
1.2.2. Effet fongicide des huiles essentielles sur le Foc.....	4
1.3. Test antagoniste des <i>Trichoderma in vitro</i>	5
1.3.1. Préparation des espèces de <i>Trichoderma</i>	5
1.3.2. Test de contact direct.....	6
1.3.3. Test de contact indirect.....	6
1.4. Activité antifongique <i>in vitro</i>	7
1.4.1. Préparation de l'inoculum de Foc et inoculation de substrat.....	7
1.4.2. Préparation de l'inoculum de <i>Trichoderma spp</i> et traitement des plantes de pois chiche.....	7
1.4.3. Préparation des huiles essentielles et pulvérisation de substrat.....	8
1.4.4. Traitement individuels et intégrées.....	8
1.4.4. a. Traitements individuels.....	8
1.4.4. b. Traitements intégrées.....	9
1.5. Exploitation des résultats et analyses statistiques.....	10

CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effet des huiles essentielles sur la croissance mycéliennes du Foc.....	13
--	-----------

2.2. Effet des espèces de <i>Trichoderma</i> contre le Foc <i>in vitro</i>	15
2.3. Efficacité des huiles essentielles dans la diminution de la sévérité du Foc <i>in vivo</i>	18
2.4. Effet des espèces <i>Trichoderma in vivo</i> contre le Foc.....	20
2.5. Efficacité des traitements combinés contre le Foc.....	21
Discussion	23
Conclusion	31
Références bibliographiques	

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Photos de deux espèces végétales utilisés dans cette étude.....	3
Figure 02: Modalités des tests antagonistes	6
Figure 03: Schéma représentatif des différents traitements individuels et associés effectués dans cette étude	9
Figure 04: Efficacité des huiles essentielles de <i>T. pallescens</i> et <i>C. citratus</i> contre le Foc <i>in vitro</i>	13
Figure 05: Résultats de test de confrontation directe des espèces de <i>Trichoderma spp</i> contre le Foc.....	16
Figure 06: Observations microscopiques de la zone de confrontation entre <i>Trichoderma</i> et le Foc	16
Figure 07: Résultats de test de confrontation directe des espèces de <i>Trichoderma spp</i> contre le Foc	17
Figure 08: Résultats de test de confrontation A) directe et B) indirect des espèces de <i>Trichoderma spp</i> contre le Foc	17
Figure 09: Effet <i>in vivo</i> des différentes formulations des huiles essentielles sur la sévérité de la maladie	18
Figure 10: Résultats des traitements de la variété Flip 90-13C par les différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>T. pallescens</i> et <i>C. citratus</i>	19
Figure 11: Résultat de pouvoir fongicide des espèces de <i>Trichoderma in vivo</i> vis-à-vis le Foc	20
Figure 12: Résultats des tests antagonistes de trois espèces de <i>Trichoderma sp in vivo</i> .	21
Figure 13: Sévérité des symptômes de flétrissement vasculaire sur les plantules de pois chiche après les traitements	22
Figure 14: Résultats des traitements combinés	22

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: L'effet des huiles essentielles de <i>T. pallescens</i> et <i>C. citratus</i> sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies du FOC	14
--	----

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcentage.

ITGC: Institut Technique des Grandes Cultures.

FOC: *Fusarium oxysporum f.sp ciceris*.

PDA: Potato Dextrose Agar.

MGI: La croissance radiale d'inhibition.

PDB: Potato Dextrose Broth.

DI: L'incidence.

ISM: l'Indice de Sévérité Moyenne.

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

AUDPC: Area Under Disease Progression Cruve.

ANOVA: l'analyse de la variance.

GLM: Generalized Linear Models.

HEs: Huiles Essentielles.

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse.

Sp: Espèce.

mg : Milligramme.

g : gramme.

µl : Microlitre.

ml : millilitre.

cm : centimètre.

INTRODUCTION

Introduction

L'utilisation de composés chimiques en agriculture a donné résultats positifs contre un large éventail d'agents pathogènes qui affectent les cultures. Cependant, les préoccupations ont survenues en raison de la sensibilité décroissante des maladies à la lutte chimique, les effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine (Monfil et Casas-Flores 2014), ainsi que l'apparition des souches résistantes à un ou plusieurs pesticides (Goulson 2013). Un véritable intérêt a été accordé au développement de moyens alternatifs de lutte contre les maladies et les ravageurs des plantes.

Les espèces appartenant au genre *Trichoderma* spp sont bien documentés comme agents de lutte biologique efficaces contre les maladies causées par les champignons telluriques (Chet 1990 ; Herrera-Estrella et Chet 2003). Ces espèces fongiques sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines des plantes (Vinale *et al.*, 2008). Malgré leur potentielle efficacité contre beaucoup de phytopathogènes, les formulations à base de *Trichoderma* spp présentent certains inconvénients incluant la durée de vie limitée, l'efficacité avec une forte dose, une faible efficacité contre les agents pathogènes du sol et des semences et la stabilité dans un environnement défavorable (Keswani *et al.*, 2014).

L'utilisation des huiles essentielles est considérée comme des méthodes efficaces est durables pour le contrôle des maladies des plantes (Badawy et Abdelgaleil 2014 ; Ben-Jabeur *et al.*, 2015 ; Soyulu *et al.*, 2010). L'activité antimicrobienne associée aux huiles essentielles est formellement effectuée à sa richesse en composés phénoliques et terpenoïdiques tels que le carvacrol, eugénol, thymol et *p*-cymène connues par leurs effets antimicrobiens testés dans sa forme pure (Zambonelli *et al.*, 1996; Vukovic *et al.*, 2007; Tullio *et al.*, 2007 ; Soković *et al.*, 2013; McMaster *et al.*, 2014).

Bien qu'ils soient très efficaces en raison de ces potentiels principes actifs, il n'existe qu'un nombre limité de produits à base des huiles essentielles fabriqués et commercialisés. Cela est dû à quatre raisons principales : (i) de nombreuses études publiées, mais seulement quelques résultats pratiques ; (ii) législation stricte ; (iii) faible persistance des effets ; et (iv) le manque de qualité et de quantités suffisantes à des prix abordables. Ces composés sont très concentrés en principes actifs et peuvent avoir une toxicité élevée vis-à-vis les microorganismes non cibles et même peuvent affecter la plante en cas d'utilisation avec des concentrations élevées (Pavela et Benelli 2016).

Généralement, un programme de lutte efficace contre les maladies provoquées par les phytopathogènes exige l'application de plusieurs mesures (Dhawan et Peshin 2009 ; Dik *et al.*, 2002). La lutte intégrée est un système de protection qui prend en faveur la préservation de

Introduction

l'environnement et la santé du consommateur, elle intègre l'ensemble des méthodes de lutte (Dhawan et Peshin 2009).

L'utilisation de différente approche dans le contrôle et l'installation des maladies des plantes, à savoir, les agents de lutte biologique et les extraits de plantes ont été usagés comme un programme de lutte intégrée pour contrôler plusieurs maladies (El-Mougy *et al.*, 2015 ; Soković *et al.*, 2013). Cependant, peu des travaux ont été procédés sur l'efficacité des huiles essentielles en traitements intégrés avec les agents de lutte biologique. En plus, ces travaux restent limités en matière de réponses et d'éclaircissement sur l'interaction entre les différents produits utilisés comme des produits intégrés.

C'est dans ce contexte, l'objectif de la présente étude est de déterminer l'efficacité des huiles essentielles de deux plantes aromatiques à savoir *T. pallescens* et *C. citratus* les agents de lutte biologique appartenant au genre *Trichoderma* sp en traitements individuels et combinés pour envisager une lutte biologique intégrée contre le Foc. La vérification des effets des huiles essentielles sur les pathogènes, les antagonistes biologiques et la plante constitue un des principaux objectifs de notre travail.

CHAPITRE I MATERIEL ET METHODES

1. Matériel et méthodes

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles de *T. pallescens* et *C. citratus*, ainsi que les agents de lutte biologique *Trichoderma* en traitements individuels et associés afin d'envisager une lutte biologique intégrée contre le Foc.

1.1. Matériels biologiques utilisés

1.1.1. Matériels végétales

Les plantes médicinales utilisées dans cette étude pour l'extraction des huiles essentielles sont représentées par *Thymus pallescens* de Noé (Lamiacée) et *Cymbopogon citratus* Staf (Poaceae). Les plantes tests ont été récoltées à partir de la région Mascara et d'Alger, respectivement. Le cultivar de pois chiche utilisé dans cette étude est représenté par la variété FLIP 84-92C déterminée moyennement résistante selon les travaux de Moutassem (2020) par sa sensibilité au *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Cette variété nous été gracieusement fourni par l'institut technique des grandes cultures (ITGC) de Sétif.



Figure 1. Photos de deux espèces végétales utilisées dans cette étude a) *T. pallescens* et b) *C. citratus* (Moutassem *et al.*, 2021).

1.1.2. Matériels fongiques

L'agent pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) utilisé dans la partie expérimentale nous a été fourni par le laboratoire de phytopathologie issu de la collection établie par de Dr Moutassem. La souche du Foc a été isolée à partir des plantes malades présentent des symptômes de jaunissement vasculaire de pois chiche originaire de la région d'Ain Témouchent.

Les antagonistes biologiques utilisés ont constitués par cinq espèces appartenant au genre *Trichoderma* spp, à savoir *Trichoderma sp1*, *Trichoedrma sp2* et *Trichoderma sp3*. Ces trois espèces ont été isolées à partir de la rhizosphère de pois chiche, identifiées et conservées au niveau de laboratoire de phytopathologie université de Bordj Bou Arreridj (Moutassem *et al.*, 2020).

1.2. Effet des huiles essentielles sur le Foc *in vitro*

1.2.1. Extraction et formulation des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été procédée selon la technique d'hydrodistillation par l'utilisation d'une appareille de type cleaveger (Clevenger 1928). Cette technique consiste à mettre 200 g de la matière végétale sèche issue de la parte aérienne de deux plante testes dans un ballon de 2 L. cette quantité a été imprégnée avec l'eau distillée stérile. L'ensemble a été porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures. Les huiles essentielles obtenues sont récupérées puis conservées à l'obscurité à 4°C dans des flacons bien fermés hermétiquement.

Les extrais des huiles essentielles ont été formulées par le Tween 80 à 3%. Les deux huiles essentielles ont été testées avec des concentrations 15, 10, 5 2 et 1 µl/ml.

1.2.2. Effet fongicides des huiles essentielles sur le Foc

L'effet fongicide des huiles essentielles sur la croissance mycélienne de Foc a été déterminé par le test d'incorporation directe dans le milieu PDA selon la technique décrite par Soyly *et al.* (2006). Les huile déjà formulées ont été additionnées dans des flacons contenant un milieu PDA maintenue en surfusion dans un bain marie (va et viens) réglé à une température de 55°C. Après une bonne agitation les milieux PDA traité par les huiles déjà formulées sont évacuées dans des boites de pétri (9 cm) a la base de 20 ml par boite. Un disque mycélien issu d'une culture jeune âgée de 8 jours découpé à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre est disposé au centre de la boite. Les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm et incubées à 25±3°C pendant 8 jours.

Le témoin consiste en un disque mycélien disposé dans des boites de pétri contenant un milieu PDA traité avec le même volume d'eau distillée et de Tween 80 (3%). La croissance mycélienne radiale du Foc a été déterminée par la mesure de deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie pendant 8 jours après l'inoculation. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque concentration et les expériences ont été menées deux fois. La croissance radiale est exprimée en pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante :

$$\text{MGI (\%)} = \frac{(dc-dt)}{dc} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Où : *dc* représente la croissance mycélienne moyenne dans le témoin et *dt* représente la croissance mycélienne moyenne dans le milieu traité.

L'évaluation de la sporulation est effectuée selon le principe de la méthode utilisée par Maslouhy (1989). Ce test a été réalisé par un lavage avec 10 ml d'eau distillée stérile de la boîte de Pétri entière contenant du mycète, afin de libérer toutes les spores, par la suite la suspension obtenue est récupérée dans des tubes à essai stérile, le nombre de spores pour chaque échantillon est comptée par la cellule de Mallassez sous le microscope optique.

L'effet des huiles essentielles sur la germination des conidies de *Foc* a été évalué selon la procédure décrite par. 5 fragment mesurent 0.5mm de diamètre ont été inoculés dans des erlenmeyers contenant 200 ml de PDB stérilisé préalablement à 105°C pendant 20min. ces derniers ont été incubés 25°C pendant 8 jours semaine. Après filtration, la suspension de spores a été ajustée à 10⁶spores / ml (Calvet *et al.*, 1990).

Les huiles essentielles déjà formulées par le Tween 80 (3%) ont été dilués dans des tubes à essai contenant 10 ml de PDB d'une façon à obtenir les doses de 15, 10, 5, 2 et 1 µl/ml. Des aliquotes de 100 µL de la suspension sporale de *Foc* déjà préparée ont été ajoutées à chaque tube. Le témoin a été préparé avec des tubes ont reçus des doses similaires d'eau distillé stérile formulée avec le Tween 80 (3%).

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été déterminé par rapport au témoin et calculé selon la formule de **Leroux et Cred et, (1978)** :

$$I = \{1 - (Da/Db)\} \times 100$$

Da: Croissance mycélienne moyenne dans le milieu en présence de l'huile.

Db: Croissance mycélienne moyenne dans le milieu sans huile (témoin).

1.3. Test antagonistes des *Trichoderma in vitro*

1.3.1. Préparation des espèces de *Trichoderma*

A partir des cultures âgées de 7 jours du champignon, une suspension de spores de 20 spores / ml a été préparée dans des tubes contenant 10 mL de l'eau distillée stérile. Une goutte de chaque suspension a été prélevée et étalée de manière cohérente dans des boîtes de Pétri chargées par un milieu de culture PDA stérile. Ces boîtes sont ultérieurement bien scellées et incubées dans une étuve à une température ambiante de 25±3°C. Après 24h, un prélèvement d'une spore germée est effectué sous une loupe binoculaire. Cette spore a été repiquée dans

des boîtes contenant un milieu de culture PDA. Les boîtes ont été mises à incuber pendant 7 jours à 28°C (Hammill 1974).

1.3.2. Test de contact direct

L'activité antagoniste des isolats obtenus de *Trichoderma* vis-à-vis le Foc a été effectuée en utilisant la technique décrite par Benhamou et Chet (1996). Cette technique consiste à ensemercer dans la même boîte de Pétri remplie le PDA. A cet effet, deux pastilles gélosées de 6 mm de diamètre, l'une portant l'antagoniste *Trichoderma* sp et l'autre le pathogène Foc. Les deux pastilles ont été placées selon un axe diamétral à 3 cm à équidistance du centre de la boîte. Les boîtes portant le test direct sont incubées à 25±3°C. Le témoin est composé seulement de l'agent pathogène. Trois répétitions sont été maintenues pour chaque traitement.

La lecture des résultats a été effectuée 2, 4 et 6 jours après l'inoculation. L'évaluation de l'inhibition est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule 1 décrite précédemment. Après six jours, une observation de la zone de contact entre les deux protagonistes afin d'élucider le mode d'action des antagonistes.

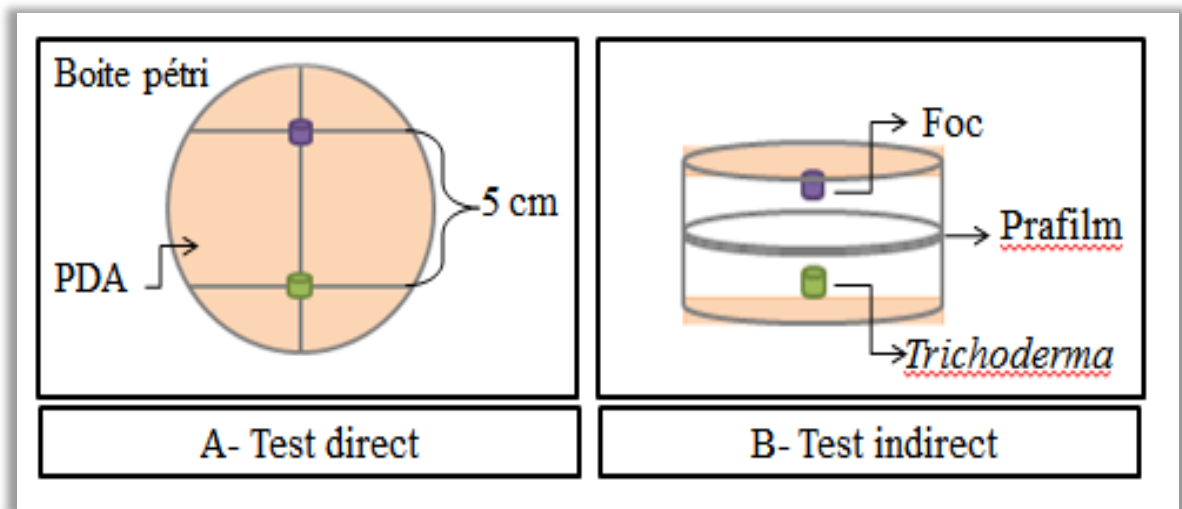


Figure 2. Modalités des tests antagonistes ; A- test direct B- test indirect.

1.3.3. Test de contact indirect

L'inhibition fongique à distance par les isolats de *Trichoderma* a été mesurée selon la méthode décrite par Dennis et Webster (1971a). A partir des cultures âgées de 8 jours des deux protagonistes, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et installée séparément au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Après l'enlèvement des couvercles de la boîte de Pétri aseptiquement, la boîte de Pétri ensemercée avec le pathogène est placée au-dessus de celle qui contient l'antagoniste *Trichoderma*.

Les deux fonds adhésifs sont bien scellés par du Parafilm afin d'éviter toute évaporation des substances volatiles. Pour le témoin, le même assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes, avec la présence seulement de pathogène. Le fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène. Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque traitement. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

1.4. Activité antifongique *in vivo*

1.4.1. Préparation de l'inoculum du Foc et inoculation de substrat

La préparation de l'inoculum de Foc a été effectuée en suivant la technique de Jimenez-Gasco *et al.* (2001). Cette technique consiste à mettre dans des sacs en plastique autoclavable un mélange de sable tamisé et ajouté à la farine de maïs humidifiée par l'eau distillée, selon la proportion 9/1/1. Le mélange a été stérilisé trois fois à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Le mélange a étéensemencé par 10 explants de 5 mm de diamètre prélevés à partir d'une culture de Foc âgées de 8 jours, puis incubés à 25°C pendant 15 jours. Une agitation des sacs tous les 3 jours est effectuée afin de permettre une colonisation homogène du milieu par le Foc.

L'inoculum ainsi obtenu est incorporé dans des pots contenant le substrat de culture stérilisé à raison de 100g d'inoculum pour 1kg de substrat. Ce dernier est composé d'un mélange de sable, de terre et de terreau selon les proportions respectivement de 1/1/1 stérilisé à 121°C pendant 24h. Le substrat a été mis en incubation dans les conditions du laboratoire pendant 21 jours.

1.4.2. Préparation de l'inoculum de *Trichoderma* spp et traitements des plantules de pois chiche

La préparation de suspension sporale de *Trichoderma* spp a été effectuée selon la méthode de Calvet *et al.* (1990). cinq fragments mesurant 6 mm de diamètre ont été inoculés dans des erlenmeyers contenant 200 mL de PDB stérilisé préalablement à 105°C pendant 20min. Ces derniers ont été bien fermés avec un coton cardé stérile, puis incubés à 25°C pendant 8 jours. Après filtration, la suspension de spores a été ajustée à 5×10^8 spores / mL.

Les graines de la variété sensible Flip 90-13C désinfectées à l'hypochlorite de sodium (1%), rincées à l'eau distillé stérile et séchées entre deux papiers filtres stériles ont été trempées dans une suspension sporale ajustée à 5×10^8 du *Trichoderma* pendant 30 min (Harman, 1991). Les graines enrobées par les antagonistes ont été mis dans des boites de pétri stériles contenant deux couches de papier filtres stériles, soigneusement imbibés par de l'eau distillé stériles est incubées à 25 °C pendant 72h. Les graines germées ont été transférées dans des pots contenant un substrat stérile, puis incubé dans les conditions de laboratoire.

1.4.3. Préparation des huiles essentielles et pulvérisation de substrat

Dans des pots contenant le substrat inoculé par le Foc préparé préalablement selon la technique décrite par Jimenez-Gasco *et al.*, (2001). Les huiles essentielles de *T. pallescens* a été formulées avec le tween 80 (3%) de façon à obtenir la concentration 0.5, 0.25 et 0.1µL/ml. Ces dernières ont été transférées dans des dispositifs de pulvérisation produisant de gouttelettes très fines. Cette formulation a été pulvérisée sur le substrat inoculé par le Foc à raison de trois applications avec un intervalle de 48h (Kamdi *et al.*, 2012). Les pots traités par les huiles ont été couverte par un papier aluminium stérile disposés dans une chambre ambiante pour assurer une meilleure efficacité des traitements.

Un pré germination des grains de pois chiche de la variété Flip 90-13C ont été effectuées. Les grains mise en germination ont été préalablement désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium (1%), lavées dans de l'eau distillée stérile, séchées entre deux papier filtres, puis installées dans des boites de pétri contenant de papier filtres stériles et incubées à 25°C. Les graines germées ont été transférées dans des pots contenant un substrat stérile. Après huit jours, les plantules de pois chiche ont été baignées dans les formulations des huiles essentielles à base de *T. pallescens* et *C. citratus* pendant 30 min. après son immersion les plantules ont été transférées dans des pots.

1.4.4. Traitements individuels et intégrées

a- Traitement individuels

Les traitements individuels effectués durant cette étude sont représentés par le traitement de substrats avec les trois concentrations de deux huiles essentielles d'une part et l'enrobage de la semence par deux espèces de *Trichoderma*.

b- Traitement intégrée

Dans le but de mettre en évidence l'efficacité de traitement intégrés les semences de deux variétés du pois chiche inoculées précédemment par les espèces fongiques (*Trichoderma*

sp1 et *Trichoderma* sp2) les semences de la variété Flip 90-13C traités préalablement par les deux espèces de *Trichoderma* ont été semés dans des pots contenant un substrat déjà inoculé par le Foc et traités avec les espèces les huiles essentielles de *T. pallescens* et *C. citratus* selon les combinaisons suivants :

- Traitement (T1) : *Trichoderma* sp2+ huile essentielle de thym (5 µL/mL).
- Traitement (T2) : *Trichoderma* spp 1 + huile essentielle de thym (5 µL/mL).
- Traitement (T3) : *Trichoderma* sp2+ huile essentielle de citronnelle (5 µL/mL).
- Traitement (T4) : *Trichoderma* sp2+ huile essentielle de thym (5 µL/mL).
- Traitement (T+) : inoculum de Foc+ semences traitées avec le Tween 80 eau distillée stérile. Traitement (T-) : pas d'inoculum+ semences traitées avec le Tween 80 (3%) + eau distillée stérile.

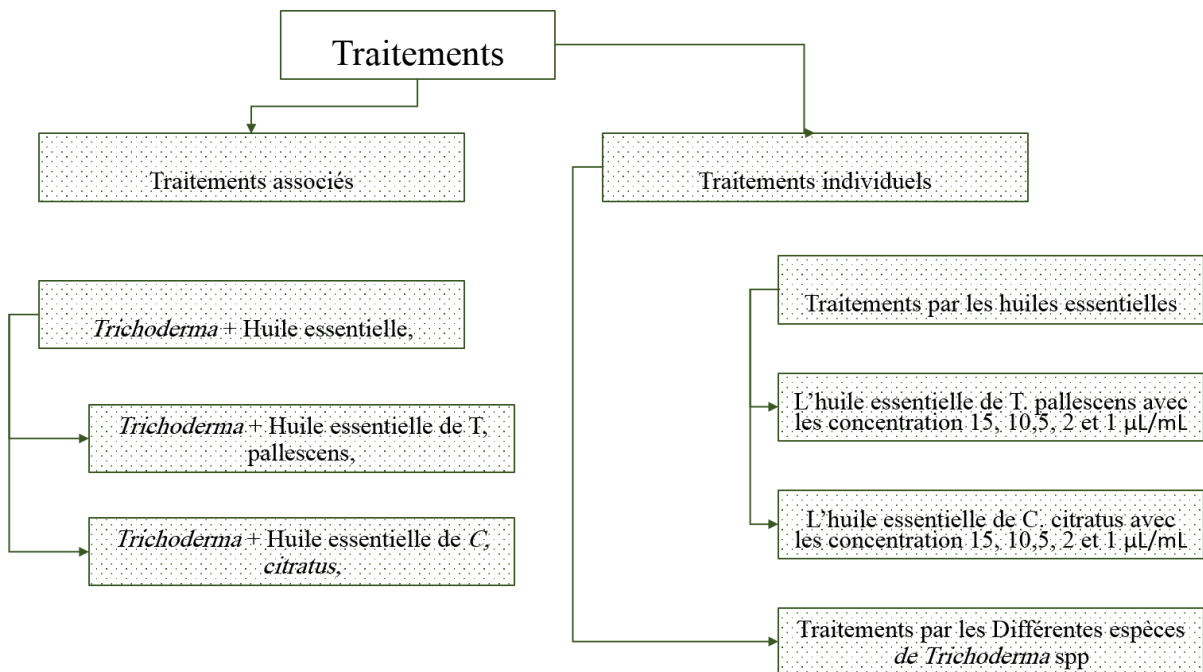


Figure 3. Schéma représentatif des différents traitements individuels et associés effectués dans cette étude.

Le traitement de substrat a été procédé par la pulvérisation de substrat inoculé par le Foc par une suspension sporale de *Trichoderma*. Le substrat traité a été mise à incubation dans les conditions de laboratoire. Après 21 jours d'incubation une pulvérisation de substrat traités par *Trichoderma* a été traités aussi par des formulations à base de huile essentielle de *C. citratus* et *T. pallescens*.

1.5. Exploitation des résultats et analyses statistiques

Le prélèvement des résultats est fondé sur l'observation des symptômes et la notation de l'incidence (DI) et la sévérité (ISM) de la maladie pendant 40 jours. Les deux notations sont exprimées en index de maladie DII. Lors de chaque notation, l'incidence et la sévérité de la maladie ont été évaluées selon les méthodes de Trapero-Casas (1983). L'incidence (**DI**) est évaluée selon la formule:

$$DI = \frac{NPM}{NTP} \times 100$$

- La sévérité (S) ou l'indice de sévérité moyenne (ISM) est calculée selon la formule :

$$S \text{ ou } (ISM) = \frac{\sum ni \times nj}{\sum nj}$$

Où

n_j est le nombre de plantes caractérisées par l'indice i_j est l'indice de sévérité attribué aux plantes malades.

- 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 symptômes.

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

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

3: symptômes identiques affectant la plante entière.

4: plante morte.

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

$$DII = \frac{DI * ISM}{4}$$

- L'AUDPC est calculé selon la formule rapportée par Cook, (2006) :

$$AUDPC = \left[\frac{x_i + x_{i+1}}{2} \right] (t_{i-1} - t_i)$$

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 de la valeur de l'AUDPC sont soumises à des analyses de la variance, chaque traitement étant représenté par quatre répétitions pour trois variables variété, antagonistes et extrais bioactif). 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 et 1%. L'analyse statistique a été faite avec une procédure générale des modèles linéaires avec SAS (version 6.08) (SAS inc., Cary, NC).

CHAPITRE II RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne du Foc

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation de deux plantes médicinales ont été analysées pour évaluer leur activité antifongique vis-à-vis le Foc. L'activité antifongique a été évaluée *in vitro* par la technique d'incorporation dans le milieu de culture. Les résultats obtenus suite à ce travail montrent que la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores du Foc ont été inhibées par les huiles essentielles à des degrés variés, selon l'huile essentielle ainsi que la concentration utilisée. Selon les résultats obtenus après traitement statistique des données par un simple test ANOVA, les différences liées au contrôle étaient extrêmement importantes. Autrement, l'analyse des données montre que les activités inhibitrices de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores sont des doses dépendantes, elles augmentent significativement avec l'augmentation de la concentration.

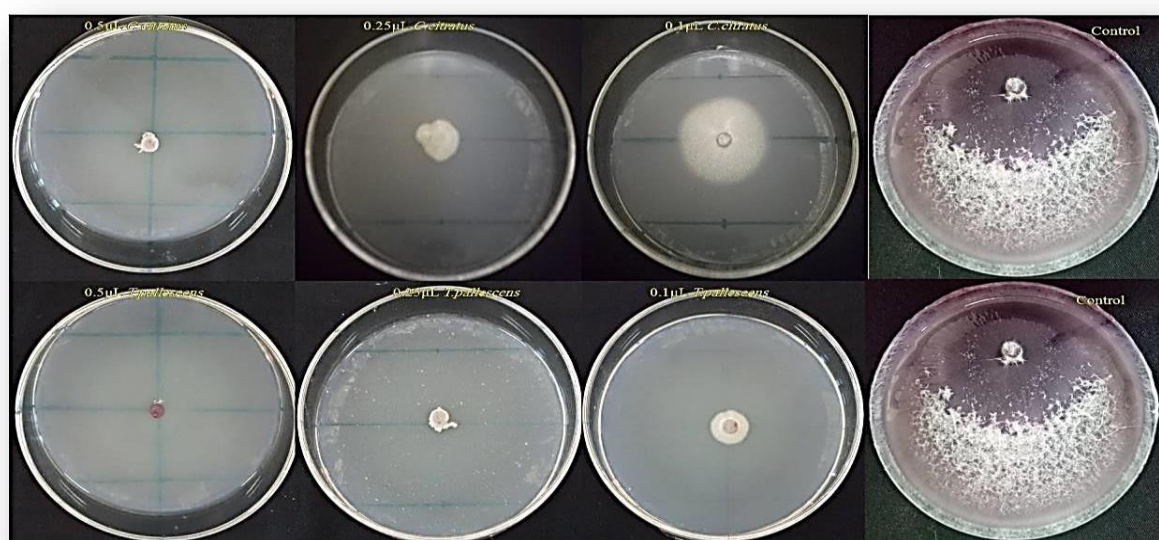


Figure4. Efficacité des huiles essentielles de *T. palleseus* et *C. citratus* contre le Foc *in vitro*.
« Original »

Dans le but de tester l'effet des deux traitements étudiés (Espèce et la concentration)

Ainsi que celui de l'interaction entre ces deux facteurs sur la variation de la zone d'inhibition ; nous avons réalisé une analyse de la variance ANOVA par GLM qui est composée par deux facteurs. Les résultats de test de probabilité sont montrés dans le tableau 01.

D'après l'ANOVA, l'espèce, la concentration et l'interaction entre les deux facteurs ont montré un effet très hautement significatif ($P = 0.0011043$; $F = 3.2212$) sur la variation de la zone d'inhibition (tableau 01). Ce dernier effet a été expliqué par la séparation très nette des différents groupes homogènes des deux facteurs étudiés.

Chapitre II. Résultats et Discussion

A cet effet, l'huile essentielle de *T. pallescens* a montré une inhibition totale de la croissance mycélienne avec les concentrations 15, 10 et 5 $\mu\text{L/mL}$. Cependant, la zone d'inhibition elle est supérieure à 56.85% par les concentrations 2 et 1 $\mu\text{L/mL}$. L'huile essentielle de *T. pallescens* a exercé une importante activité inhibitrice de la sporulation et la germination des spores vis-à-vis le Foc. Ces dernières se sont montrées plus sensible à la concentration 15, 10 et 5 $\mu\text{L/mL}$, dont elle a été suffisante pour arrêter leur croissance avec un taux de 100%. En outre, les deux concentrations 2 et 1 ont inhibé la sporulation et la germination des spores par des pourcentages de supérieurs à 65,42%.

Tableau 1. L'effet des huiles essentielles de *T. pallescens* et *C. citratus* sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies du FOC. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions \pm l'erreur standard. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seul de 5%.

Huile essentielle	Doses $\mu\text{L/ml}$	MGI (%)	SI (%)	SGI (%)
<i>T.pallescens</i>	1	56,85 \pm 1,71c	65,42 \pm 3,54b	66,83 \pm 0.60bc
<i>T.pallescens</i>	2	89,51 \pm 1,71b	85,42 \pm 3,54b	86,83 \pm 0.60bc
<i>T.pallescens</i>	5	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a
<i>T.pallescens</i>	10	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a
<i>T.pallescens</i>	15	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a
<i>C. citratus</i>	1	10,50 \pm 2,77e	12,59 \pm 4,88e	27,26 \pm 0.66d
<i>C. citratus</i>	2	20,50 \pm 2,77d	32,59 \pm 4,88d	47,26 \pm 0.66bc
<i>C. citratus</i>	5	42,57 \pm 6,3c	60,37 \pm 4,78c	60,50 \pm 0.90ab
<i>C. citratus</i>	10	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a
<i>C. citratus</i>	15	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a	100,00 \pm 0,00a
<i>P</i>	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> =0.000	<i>P</i> =0.000

En parallèle, l'huile essentielle de *C. citratus* est plus moins efficace en comparaison avec celle de *T. pallescens*. Dans ce cadre, les deux concentrations 15 et 10 $\mu\text{L/mL}$ ont montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, alors que les concentrations 5, 2 et 1 $\mu\text{L/mL}$ ont manifesté des zones d'inhibition variable entre 10,5 et 42.57%.

Dans le cas du traitement avec *C. citratus*, la sporulation ainsi que la germination des spores ont été réduit. Ainsi, les valeurs enregistrées pour les concentrations 15 et 10 $\mu\text{L/mL}$ (100%).

2.2. Effet des espèces de *Trichoderma* contre le Foc *in vitro*.

L'ensemble des souches de *Trichoderma* ont été testées afin de mettre en évidence leurs activités antifongiques vis-à-vis le Foc, par la technique de confrontation directe et indirecte. L'analyse ANOVA effectuée sur les tests de confrontation directe a montré un effet très hautement significatif ($P=0.000$; $F = 29.709$) de l'espèce fongique ainsi que le temps ($P=0.0001$; $F = 140.851$) de confrontation sur la croissance mycélienne du Foc.

L'analyse des résultats mentionnés dans la figure 6 montre l'efficacité de trois espèces de *Trichoderma* contre le Foc. Après 48h de confrontation, les zones d'inhibitions sont variables entre 29.41 et 48.21% dont les valeurs faibles sont notées chez *Trichoderma* spp1 et la plus élevée a été notée chez *Trichoderma* spp2. Par ailleurs, les taux d'inhibition du Foc augmentent au fur et à mesure l'augmentation du temps de confrontation par les trois espèces de *Trichoderma* testées. Après 8 jours (172h) de confrontation les trois isolats *Trichoderma* spp1, *Trichoderma* spp2 et *Trichoderma* spp3 ont marqués des zones d'inhibition environ 83.18, 88.97 et 80.08%, respectivement. Des observations microscopiques réalisées sur la zone de contact entre les trois espèces de *Trichoderma* et le Foc, montrent une modification au niveau du mycélium, se marquant par une lyse importante, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *Trichoderma* sur celui du Foc.

La technique de confrontation indirecte nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance des isolats de trois isolats du *Trichoderma* 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. Les résultats obtenus montrent un ralentissement de la croissance mycélienne du FOC exercée par tous les trois isolats du *Trichoderma* comparativement aux témoins. Contrairement au test de confrontation directe, on remarque que la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps.

L'analyse de la variance ANOVA a montré un effet très hautement significatif ($p<0.00001$) de l'espèce sur la croissance mycélienne du Foc. Cet effet significatif se traduit par un regroupement des souches en fonction de leur ressemblance vis-à-vis le taux de l'inhibition de la croissance mycélienne du FOC.

Les données affichées sur la Figure 15 indiquent que la croissance mycélienne des témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations pathogène et antagoniste. Les résultats obtenus après 48h de confrontation montrent l'existence d'une réduction du diamètre moyen des colonies de tous les isolats du Foc par rapport au

témoin, provoquant ainsi des zones d'inhibition variables, dont la plus faible a été notée chez *Trichoderma* spp1 (29.41%) et la plus élevée est constatée chez *Trichoderma* spp2 (48.21%).

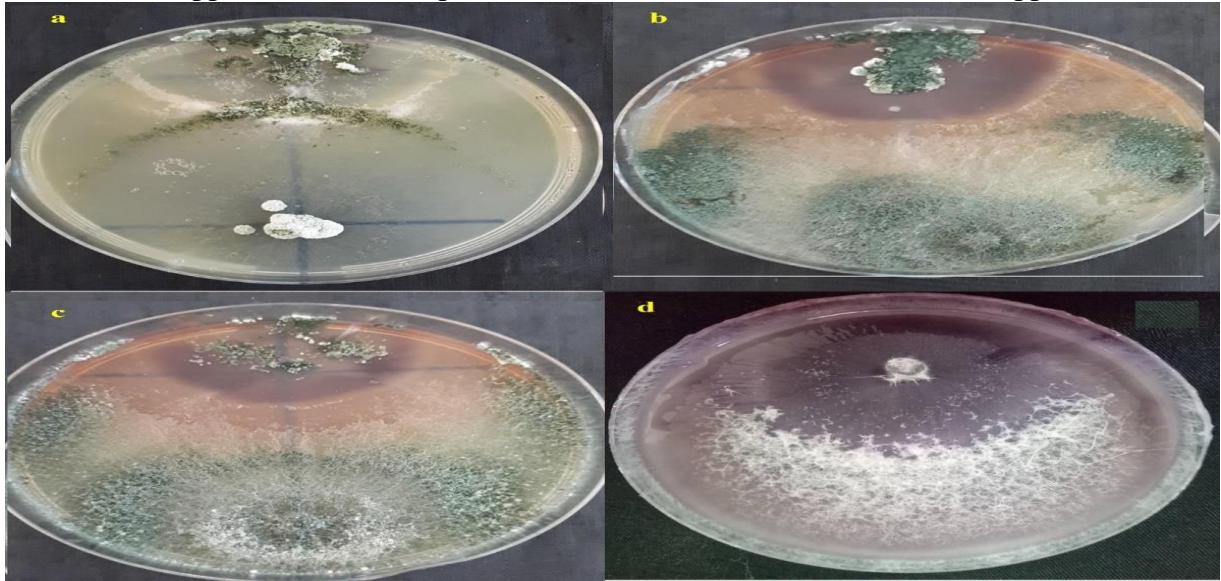


Figure 05. Résultats de test de confrontation directe des espèces de *Trichoderma* spp contre le Foc. « Original »

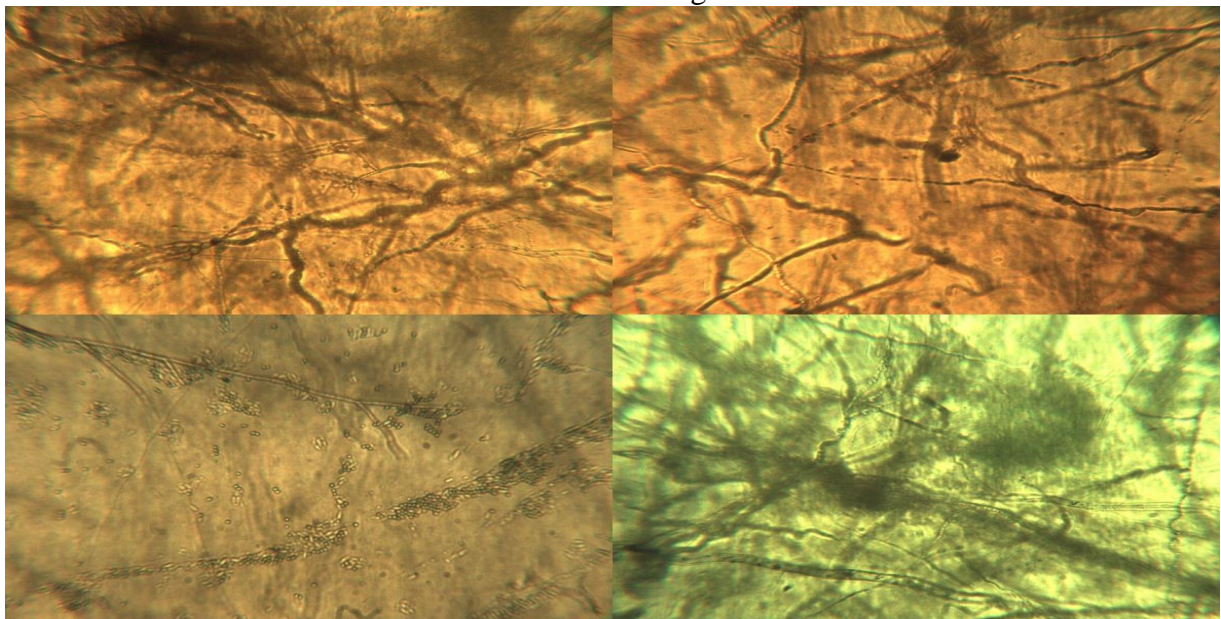


Figure 06. Observations microscopiques de la zone de confrontation entre *Trichoderma* et le Foc. a) enroulement de mycélium de *Trichoderma* sur le Foc, b) vacuolisation et c) lyse des hyphes de Foc. « Original »

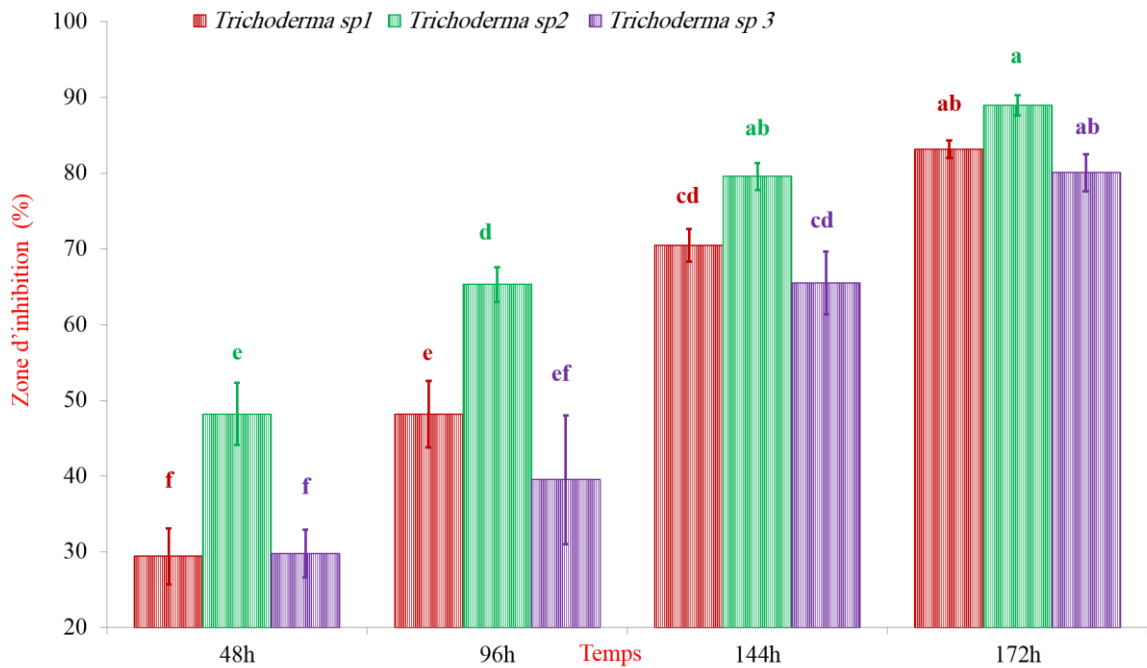


Figure 07. Résultats de test de confrontation directe des espèces de *Trichoderma spp* contre le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions \pm ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

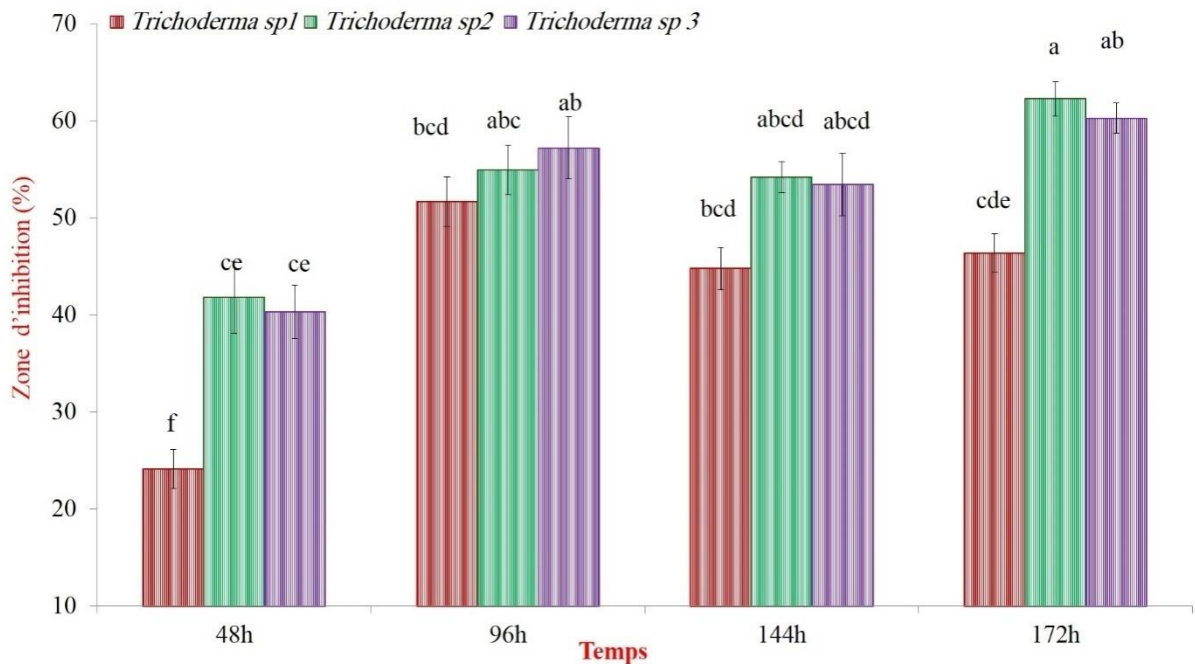


Figure 08. Résultats de test de confrontation A) directe et B) indirect des espèces de *Trichoderma spp* contre le Foc. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions \pm ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

La zone d'inhibition augmente significativement suivant le temps de confrontation. Après 172h de confrontation des zones d'inhibitions marquées sont plus au moins intéressantes. Cependant, la zone d'inhibition la plus élevée et marquée chez *Trichoderma* spp2 (88.97%) et la plus faibles chez *Trichoderma* spp1 (83.18%).

2.3. Efficacité des huiles essentielles dans la diminution de la sévérité du *Foc* *in vivo*

Les résultats obtenus après l'application des huiles essentielles extraites à partir de *T. pallescens* et de *C. citratus* *in vivo* montrent un effet fongicide sur le *Foc*. Les symptômes de la maladie ont été observés 28 jours après le semis sur les plantules traitées avec l'huile essentielle de *T. pallescens* par rapport au témoin positif 12 jours après le semis et 22 jours après le semis sur les plantules traitées avec l'huile essentielle de *C. citratus*.



Figure 9. Effet *in vivo* des différentes formulations des huiles essentielles sur la sévérité de la maladie. « Original »

D'après l'ANOVA, l'espèce, la concentration et l'interaction entre les deux facteurs ont montré un effet très hautement significatif ($P=0.64134$; $F=0.4610$) sur la variation de la valeur de l'AUDPC. En outre, le traitement de données par les analyses G.L.M a mis en évidence l'efficacité de l'huile essentielle de *T. pallescens* dont la diminution de la gravité de la maladie. Une gamme de concentration de 0.1 et 0.5 et 1 $\mu\text{l/ml}$ a été choisie. Elle a permis d'établir des courbes dose-effet (figure12). La courbe exprime la relation entre la dose testée et l'effet fongicide montrent une activité dose-dépendante. En général, les résultats obtenus avec les différentes concentrations de l'huile essentielle révèlent que l'activité fongicide croît au fur et à mesure que la concentration augmente. La dose forte 1 $\mu\text{l/ml}$ semble la plus intéressante pour comparer par les doses 0.5 et 0.1 $\mu\text{l/ml}$.

A cet effet, les valeurs de l'AUDPC notées chez les plantules de pois chiche traitées par l'huile essentielle de *T. pallescens* sont variables entre 71.67 et 341.6 expliquent une diminution de la gravité de la maladie entre 77.12% et 95.2%. Néanmoins, les valeurs notées chez les plantules traitées avec l'huile essentielle de *C. citratus* sont plus au moins supérieures, et sont variables entre 223.33 et 569.67, montrent une diminution de la gravité de la maladie variable entre 60.04% et 85.04%.

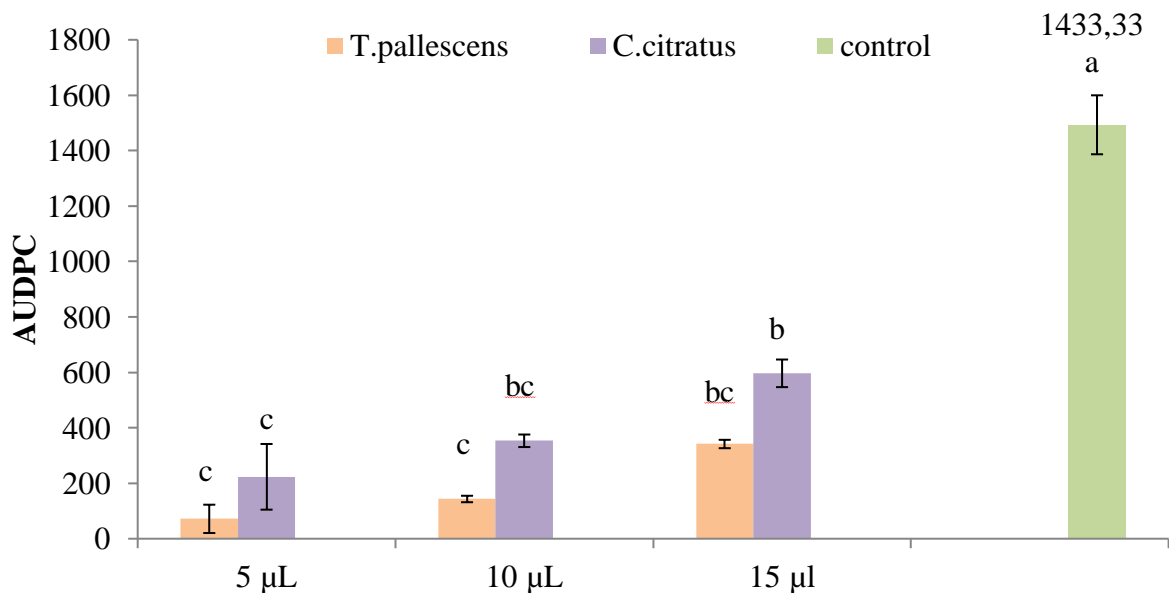


Figure 10. Résultats des traitements de la variété Flip 90-13C par les différentes concentrations de l'huile essentielle de *T. pallescens* et *C. citratus*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions \pm l'erreur standard. Les lettres : a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

2.4. Effet des espèces de *Trichoderma in vivo* contre le Foc

Le traitement de la semence de la variété Flip 90-31C par les trois espèces de *Trichoderma* a montré également une efficacité très intéressante contre le Foc *in vivo*. D'après l'ANOVA, l'espèce de *Trichoderma* a montré un effet très hautement significatif ($p=0.00013$; $F = 28.018$) sur la variation de la valeur de l'AUDPC. La lecture des données affichées sur la figure montre une diminution de la valeur de l'AUDPC dans les trois traitements comparativement au témoin non traité. Les valeurs de l'AUDPC notées chez les plantules traitées avec les trois espèces fongiques sont variables entre 566.67 et 891.67 expliquent une réduction de la maladie variable entre 40.29% et 62.05 %. Dans ce cadre, *Trichoderma* spp2 est la plus efficace et *Trichoderma* spp3 est la faiblement efficace.

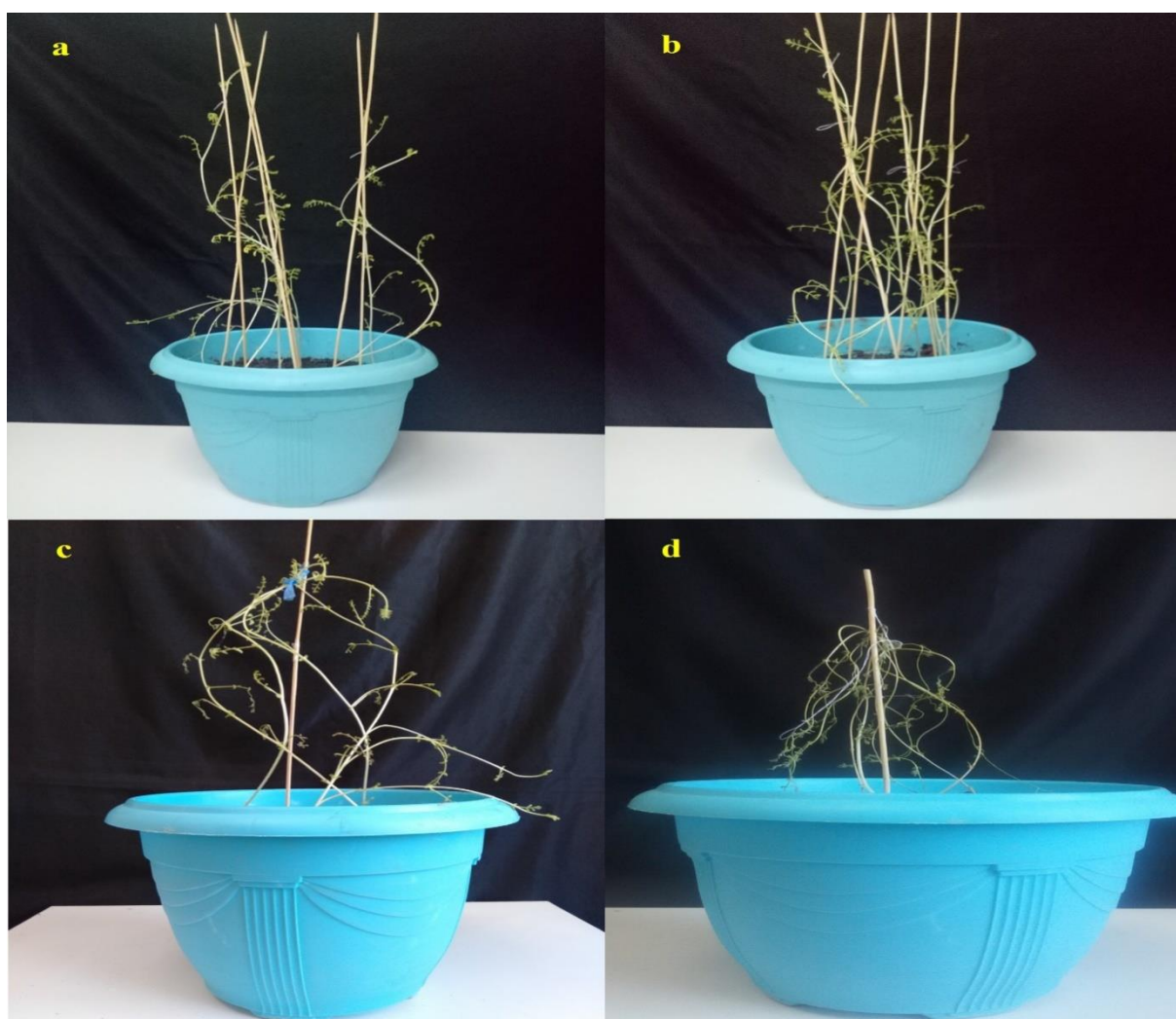


Figure 11. Résultat de pouvoir fongicide des espèces de *Trichoderma in vivo* vis-à-vis le Foc.
« Original »

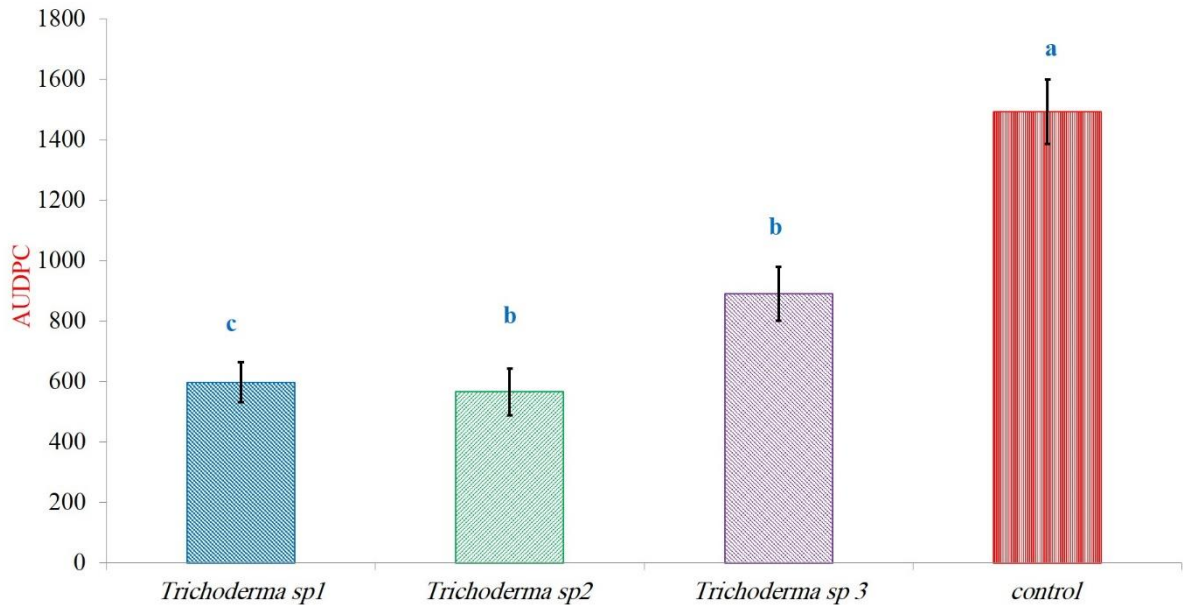


Figure 12. Résultats des tests antagonistes de trois espèces de *Trichoderma spp in vivo*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à $p < 0,05$.

2.5. Efficacité des traitements combinés contre le Foc

L'association des traitements a également indiquée une diminution plus importante de la sévérité de la maladie comparée avec le traitement unique avec les antagonistes ou avec les huiles essentielles. Les symptômes de la maladie ont été observés pendant la quatrième semaine après le semis pour le traitement des semences par *Trichoderma spp2* combiné avec l'huile essentielle de *T. pallescens* et 25 jours après pour le traitement *Trichoderma spp1* combiné avec l'huile essentielle de *C. citratus*. D'après l'ANOVA tous les traitements testés ont un effet très hautement significatif ($P = 0.11043$; $F = 3.2212$) sur la sévérité de la maladie.

L'analyse des résultats affichés dans les figures montre que tous les traitements sont efficaces et les différences entre eux sont moins marquées. Cependant, les combinaisons *T. pallescens/ Trichoderma spp2* et *C. citratus/ Trichoderma spp2* semblent les plus efficaces. Ces deux traitements ont montré des valeurs de l'AUDPC environ 205 et 273.33 expliquent une réduction de la sévérité de la maladie environ 80.93% et 85.69% respectivement. En revanche, les valeurs les plus élevées ont été constatées chez les plantules traitées avec la combinaison *C. citratus/ T. viride* environ 160 qui traduit une diminution de la gravité environ 83.83%.

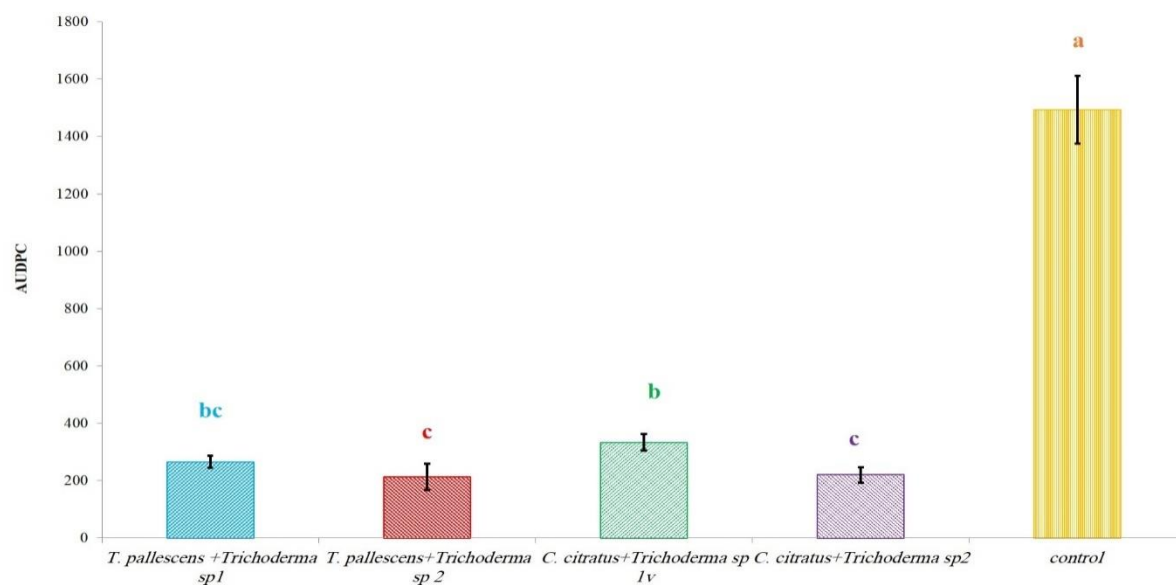


Figure13. Sévérité des symptômes de flétrissement vasculaire sur les plantules de pois chiche après les traitements : (a) : *Trichoderma* spp1+ huile essentielle de thym, (b): *Trichoderma* spp2+huile essentielle de thym, (c): *Trichoderma* spp3+ huile essentielle de citronnelle, (d): Témoin négatif

Figure 14. Résultats des traitements combinés. Les données sont les moyennes de 3 répétitions de taux des polyphénols ou des flavonoïdes ± ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à $p < 0,05$.

3. Discussion

L'utilisation abusive des pesticides de synthèse et de leurs effets indésirables sur la santé humaine, animale et les risques toxicologiques sur l'environnement ont généré un intérêt mondial accru pour développer d'autres sources alternatives aux produits chimiques qui seront utilisés dans la gestion des phytopathogènes. Les bioproduits d'origines végétales et fongiques contenant des molécules biologiquement actives, qui sont bénéfiques pour l'humanité (Soković *et al.*, 2013). Ces produits ont été avérés d'une grande activité antimicrobienne et jouent un rôle important dans la lutte contre les bio-agresseurs des végétaux.

Dans le temps moderne, les études relevant sur les interactions entre les différentes ressources naturelles sont également approfondies, en raison d'avoir élucidé les types d'interactions, qui peuvent être soit synergique ou antagoniste et par conséquent leurs effets sur l'interaction hôte pathogène (Soković *et al.*, 2013). Dans ce cadre, l'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'efficacité des traitements biologiques individuels et intégrés des huiles essentielles extraites à partir de deux plantes médicinales ; *T. palleescens* et *C. citratus* et les antagoniste biologique de type *Trichoderma* spp contre l'agent pathogène Foc responsable de la fusariose vasculaire de pois chiche *in vivo* et *in vitro*.

Cette étude, nous a permis de mettre en évidence l'efficacité potentielle des huiles essentielles et des *Trichoderma* contre le Foc *in vitro* et *in vivo* en traitement individuels. Un effet fongicide très important a été constaté sur le Foc avec une réduction de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores avec des taux variables entre 10 à 15 %, 10 à 15% et 10 à 15%, respectivement. Cependant, l'huile essentielle a été avérée la plus efficace. Une réduction significative de la sévérité de la maladie *in vivo* avec des fréquences environ 10% pour l'huile essentielle de *T. palleescens*, 15% pour les plantules traitées par *T. viride* en traitements individuels. Un des facteurs intervenants sur l'intensité de l'action antifongique des huiles essentielles est la concentration appliquée, ceci a été généralement confirmé *in vitro* et *in vivo*. Ceci a été évident dans notre étude, où nous avons remarqué que le taux d'inhibition de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies augmentent significativement avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles.

En effet, les huiles essentielles ont montré une activité antifongique contre une variété de pathogènes et parasites des plantes (Soyluet *al.*, 2006 ; Soyluet *al.*, 2010). Le pouvoir antifongique et les différences observées dans l'efficacité des deux huiles essentielles sont expliqué d'une part et par la composition et la richesse des huiles testées en composés antifongiques et de leurs variabilités en fonction le type de l'huile essentielle d'autre part. D'après les résultats de l'analyse par CPG effectuées par Moutassem *et al.* (2019), Moutassem

et al., (2021), il paraît que les composés phénoliques sont les constituants majeurs de l'huile essentielle de *T. pallescens* notamment le carvacol (54,64%), le thymol (16,24%) et le β -binène. Cependant, l'huile essentielle de *C. citratus* sa richesse en gèranial (48,1%), néral (34,6 %), Camphène (7.88%), Limonène (7.9%) et Citronellal (2.37%). Ces substances ont été marquées par leur pouvoir antifongique contre une variété de parasite de plante.

Le carvacrol et le thymol ont été avérées fortement efficace contre une multitude de pathogènes et compris l'espèce *Fusarium oxysporum* même avec des concentrations faibles (McMaster *et al.*, 2013 ; Suwanamornlert *et al.*, 2018), tandis que le gèraniol, citral, citronellal et geraniol sont avérés antifongique contre la même espèces à des concentrations plus au moins élevées (McMaster *et al.*, 2013, Moleyar et Narasimham 1986). A ce titre, les fréquences d'inhibition variables entre 20 et 40% avec des doses de 100 μ g/ml. Ces expliquent l'efficacité de l'huile essentielle de thym comparé avec celle de la citronnelle.

L'activité antifongique des huiles essentielles ainsi que ces dérivées, en particulier le thymol, le carvacrol et le geraniol, peut se faire selon différents mécanismes. Ces mécanismes peuvent être manifestés par une attaque sur la composition phospholipidique des membranes cellulaires fongiques, la perturbation des systèmes enzymatiques, l'inactivation puis la destruction du matériel génétique fongique, l'hydroperoxydase est la formation des acides gras par l'oxygénation des acides gras insaturés, la coagulation du cytoplasme, la perturbation de la force motrice protonique, le flux d'électrons et le transport actif (Badawy et Abdelgaleil 2014). *In vivo*, l'efficacité des huiles essentielles peut être attribuée sur les mécanismes de résistance des plantes. Dans notre travail, cette conclusion a été confirmée, où nous avons constaté que les huiles essentielles induisent à la fois une résistance localisée et systémique dans les plantules de pois chiche contre le Foc. À cet effet, aune augmentation des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les racines et les tiges des plantules traitées avec les huiles essentielle comparées avec les témoins non traités, mais avec un degré plus chez celles traitées par l'huile essentielles de *T. pallescens* comparée avec *C. citratus*.

De plus, l'effet des huiles essentielles sur la maladie pourrait être directement lié l'accumulation intensive de substances phénoliques dans la plante infectée (Ben-Jabeuret *al.*, 2015). Ces auteurs, ont constaté une réduction significative de l'incidence et de la gravité de flétrissement vasculaire de la tomate causé par *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersisi*. Après sept jours de traitement une réduction de 30.76% a été observée. Par ailleurs, les mêmes auteurs montrent bien que l'effet biologique des huiles essentielles dans la réduction de la gravité fusarienne est accompli par l'activation des mécanismes de défense de la plante via une augmentation des quantités produites des composés phénoliques et la voie des peroxydases dans

les racines et les feuilles. Par conséquent, l'expression de nombreux gènes de défense et les gènes de biosynthèse de métabolites secondaires.

En effet, les huiles bioactives des plantes exercent une activité fongicide contre la population fongique du sol, celui-ci est témoigné par les travaux de Belabid *et al.* (2010). Le traitement du sol par les huiles essentielles de neuf plantes médicinales inoculé préalablement par *F. oxysporum* f. sp *lentis* diminue significativement la population de Fol dans le sol et par conséquent, l'incidence de la maladie. Le traitement du sol par 10 huiles essentielles extraites de différentes aromatiques plantes y compris l'huile de thym diminue significativement la population des champignons avec des fréquences supérieures à 30 % et l'huile de thym constatée la plus efficace (Stević *et al.*, 2014). Les travaux effectués par Moutassem *et al.* (2019) portés sur l'effet des huiles essentielles sur le Foc montrent une diminution significative de la sévérité de la maladie. Ces travaux indiquent que les huiles essentielles de *T. pallescens* et *C. citratus* diminuent la sévérité de flétrissement vasculaire avec des taux variables entre 60 et 90% en fonction l'huile essentielle et la concentration utilisée, ce qui en accord avec nos résultats.

Nos résultats suggèrent l'efficacité des espèces de *Trichoderma* contre le Foc *in vitro* et *in vivo* contre le Foc. Ces espèces affectent le Foc par différents mécanismes antagonistes en particulier l'hyperparasitisme, l'antibiose et la sécrétion des métabolites secondaires. Un nombre important d'études récentes a porté sur l'effet de *Trichoderma spp* sur plusieurs parasites des plantes (Zhang *et al.*, 2016, El-Debaiky, 2017; Braun *et al.*, 2018 ; Moutassem *et al.*, 2020). Ces deux espèces impliquent des mécanismes variés pour inhiber les phytopathogènes, dont les principaux sont le mycoparasitisme et l'antibiose (Chet, 1990).

Dans notre étude, nous avons démontré à travers l'observation microscopique de la zone d'interaction entre des hyphes les deux protagonistes ont indiqué que les hyphes de *Trichoderma* enroulent autour des hyphes de pathogènes (Foc) et inhibent sa croissance mycélienne. Des modifications profondes au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *Trichoderma spp*. Ceci est conforme aux résultats antérieurs rapportés par plusieurs chercheurs (Toghueo *et al.*, 2016; El-Debaiky, 2017 ; Moutassem *et al.*, 2020, Mouatssem, 2020).

Autrement, les *Trichoderma* produisent typiquement des molécules bioactives qui peuvent influencer les interactions plantes/agents pathogènes (Dennis et Websters 1971a, Toghueo *et al.*, 2016). Ces espèces, produisent beaucoup de métabolites secondaires qui peuvent aussi avoir des propriétés antibiotiques, et permettent à inhiber et / ou de tuer d'autres micro-organismes en compétition (Dennis et Websters 1971a, Toghueo *et al.*, 2016). En plus,

les activités toxique contre les pathogènes des plantes, ces substances peuvent également augmenter la résistance à la maladie en déclenchant l'activité de défense systémique de la plante, et/ou améliorer la croissance des plantes.

Le mécanisme de suppression des maladies *in vivo* par les huiles essentielles des plantes et les agents de bio-contrôle ont suggéré que les principes actifs présents peuvent soit agir directement sur l'agent pathogène ou induire une résistance systémique chez les plantes hôtes résultant dans la réduction du développement de la maladie (Paul et Sharma 2002, Akila *et al.*, 2011).

Nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par Moutassem *et al.*, (2020) indiquent *in vivo*. Ces travaux exposent l'efficacité des *Trichoderma* avec des seuils variables entre 50 et 89% de diminution de la sévérité de flétrissement vasculaire de pois chiche. Les résultats obtenus corroborent ceux obtenus par Bourguda et Bouznad (2008) qui ont utilisé le traitement de la semence par les isolats de *Trichoderma* spp avant le semis dans un sol préalablement infesté par le Foc a abouti à une réduction significative de l'indice de maladie par rapport au témoin non traité. L'indice de maladie le plus faible est obtenu avec l'isolat *T. atroviride*, avec un pourcentage de réduction environ 83.92% de l'indice de maladie par apport au témoin.

Les données de l'expérience ont exposé que tous les agents biologiques testés, individuellement ou en combinaison, pourraient réduire significativement la sévérité de la maladie avec des degrés variés. Toutefois, une augmentation significative à ($P < 0,05$) de niveau de protection a été constaté lorsque les huiles essentielles sont utilisés en traitement combinés avec les *Trichoderma*, même si leurs mécanismes d'action sont différents. Cette activité prononcée des combinaisons procédées peut être due à l'effet synergique des substances bioactives des huiles essentielles avec ceux des *Trichoderma*.

Nos résultats indiquent une diminution significative de la gravité de la maladie avec des fréquences variable 55.59 et 85.93% en comparaison avec les traitements individuels des *Trichoderma* spp. Ces constatations peuvent être expliquées par l'effet synergique des composées des huiles essentielles en association avec les composés d'origine fongiques. Ces substances peuvent agir différemment sur les voies de signalisation les d'induction des mécanismes de résistance des plantules de pois chiche contre le Foc. Dans ce cadre, les molécules antimicrobiennes en combinaison avec les dérivés de plantes améliorent à la fois le spectre d'activité et le degré d'inhibition due à des effets synergiques.

Ces résultats sont probablement expliqués par l'augmentation de l'activité des précurseurs de synthèse des polyphénols chez les plantules reçues un traitement combinés

comparativement aux traitements individuels. En revanche, une diminution des taux des flavonoïdes a été constatée avec des fréquences entre 0.55 et 7.86%.

Nos résultats sont analogues à ceux obtenus par Singh *et al.* (2014), dont ils ont démontré l'augmentation des taux des polyphénols chez les plantules de pois chiche traitées avec des traitements combinés de *Pseudomonas* et *T. harzainum* contre *Sclerotium rolfsii* comparativement au traitement individuels. La quantité d'acide shikimique variait de 848.7 à 6288 $\mu\text{g/g}$, acide gallique 66.9 à 210 $\mu\text{g/g}$, acide t-chlorogénique 24.2 à 168.3 $\mu\text{g g}^{-1}$, acide tannique 58.1 à 129.1 $\mu\text{g g}^{-1}$, acide syringique de 17.27 à 576.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour les traitements individuels. Cependant, les traitements combinés sont avérée plus efficace et surmontent plus le taux des polyphénols, où l'acide shikimique s'était accumulé 7,41 fois, acide t-chlorogénique, 3 fois, acide férulique 17.6, myricétine 2.5 fois, quercétine 1.3 fois et acide syringique 11.3.

De même Jain *et al.* (2015) ont démontré que les taux des précurseurs des phénols représentés par l'acide shikimique, acide gallique, acide chlorogénique, acide syringique, acide p-coumarique, acide cinnamique, acide salicylique, myricitine et le quercitrine sont nettement augmentés chez les plantules de petits pois traitées avec un mélange de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *T. harzianum* comparativement aux traitements individuels et/ou bi traitements. Par contre, une diminution dans les taux de ces derniers chez les témoins inoculés comparativement aux témoins négatif.

A titre de l'exemple les taux de l'acide shikimique sont nettement augmentés trois fois et 4 fois plus chez les plantules de petits pois subissent des traitements avec 2 (14972 $\mu\text{g g}^{-1}$) et trois (15093.3 $\mu\text{g g}^{-1}$) agents dans lutte biologique, en comparaison avec les témoins non traités (2939.9) et les traitements individuels *B. subtilis* (6654.3 $\mu\text{g g}^{-1}$), *P. aeruginosa* (8386.8 $\mu\text{g g}^{-1}$) et *T. harzianum* (10166.5 $\mu\text{g g}^{-1}$). Dans ces plantes, l'acide shikimique est non seulement converti en d'autres phénols dans la filière, mais se forme également via l'érythrose-4-phosphate pour fournir des plantes avec un flux continu de précurseur phénolique pour lutter contre les agents pathogènes envahissants.

Les plantes traitées avec un consortium composé de trois microbes ont enregistré une augmentation de 2.73 et 2.45 fois leur teneur en acide syringique par rapport aux témoins inoculé et non inoculé, respectivement (Jain *et al.*, 2015). Les modifications des composés phénoliques dans les tissus du pois indiquent que la réponse induite par les BCA est de nature systémique, par conséquent, modifiant l'état physiologique de la plante. Par conséquent, le niveau de la protection a significativement augmenté.

Ces résultats sont conformes avec celle obtenue par El-Sharkawy *et al.* (2018) rapportent une augmentation des phénols totaux dans les plantules traitées avec les différentes espèces de

Trichoderma. Ces taux sont de l'ordre de 331.2 et 314.9 $\mu\text{g g}^{-1}$. Cette valeur devient supérieure environ (413.9 $\mu\text{g g}^{-1}$) pour le traitement combiné des plantules avec *T. viride* et *T. harzianum*.

Ces résultats sont similaires aux résultats de certaines études précédentes, qui rapportent l'effet très positif des traitements combinés des extraits bioactifs des plantes et agents biologiques contre une multitude des agents phytopathogènes par rapport aux traitements individuels par les extraits ou les agents biologiques. Ces dernières études ont prouvé l'effet dans la réduction de la gravité des maladies des plantes.

En effet, des études récentes menées par El-Sharkawy *et al.* (2018) indiquent l'efficacité d'une diminution de la sévérité de la maladie environ 57.15% après le traitement des plantules par *T. harzianum*, la même fréquence après le traitement par un mélange de champignons mycorrhiziens et plus de 85.71% avec un traitement combiné de *T. harzianum* et le mélange champignons mycorrhiziens.

Les travaux de Bill *et al.* (2014) effectués sur les fruits de *Persea americana* contre l'antracnose après un traitement par les huiles essentielles de thym et la gomme arabique, (10%), Aloevera (2%) ou le chitosane (1%) en traitement combinés et individuels indiquent l'efficacité des traitements associés en comparaison avec les traitements uniques. En référence aux résultats de cette recherche, on constate la diminution de la sévérité avec des niveaux supérieurs à 74.20% sur les plantules traitées par l'association (chitosane+thym), comparé avec les traitements individuels 63.85% et 47.20% huile essentielle de thym et chitosane, respectivement comparativement au témoin non traité. Ce constat a été expliqué par l'augmentation des niveaux des activités des peroxydase, phénylalanine ammonia-lyase, β -1,3-glucanase, chitinase, catalase et superoxyde dismutase et phénols totaux. Cependant, plus de 45% et 10% d'augmentation des taux des phénols chez les plantules traitées avec un traitement combiné de l'huile essentielle de thym et le chitosane comparé avec les contrôles non traités et les traitements individuels, respectivement.

Les recherches effectuées par Larkin, (2016) indiquent l'augmentation de la population de *T. virens* et *T. harzianum* dans le sol prétraitées avec des formulations à base de *T. harzianum* et *T. virens* en provoquant la diminution de la population fongique de *Rhizoctonia*, par conséquent diminuant sa sévérité avec des valeurs qui sont supérieures à 16%.

En effet, le pouvoir de lutte intégrée a été mis en évidence par les extraits botaniques avec les bactéries antagonistes (Akila *et al.*, 2011), les extraits avec champignons, bactéries avec les huiles essentielles le mélange huile essentielle/champignons (Abdel-Kader *et al.*,

2013), champignon x champignons (Omomowo *et al.*, 2018) et champignons x bactérie x fongicides (Dubay *et al.*, 2015).

Cette dernière constatation est en accord avec les résultats publiés récemment par El-Mougy *et al.* (2015) qui rapportent une diminution significative de l'incidence de la pourriture racinaire induite par le complexe de flétrissement *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfii* et *Macro phomina* après le traitement par l'huile essentielle de Thym et *T. harzianum* en association comparé avec les traitements uniques. Les fréquences de la maladie obtenue sont environ 16.4% pour le traitement par huile de thym et de, 12,2% pour le traitement par *T. harzianum* et 11.4% pour le traitement huile de thym+*T. harzianum* en association.

Dans les conditions de laboratoire la combinaison *Trichoderma*+huile essentielles augmente significativement l'activité antagoniste (Abdel-Kader *et al.*, 2011) contre *Sclerotinia sclerotiorum*. La croissance mycélienne de ce pathogène en traitement combiné *T. hazianum* +huile essentielle de thym est de 34.79, 56.53 et 78.27% à la concentration 0.25, 0.5 et 1% de thym respectivement comparé avec le témoin non traité, respectivement. Cependant, ces valeurs sont de l'ordre de 10, 15 17 en traitement individuels. Par ailleurs, ces valeurs sont avérées faibles environ 45.65, 76.08 et 76.09% en cas de traitement combiné *T. viride* + huile essentielle de thym.

Les études *in vivo* portées sur l'effet des extrais de *Azerdica indica* et *T. harzianum* en traitement combiné contre le Foc ont montré une efficacité supérieure à celle des traitements individuels ou équivoque à celle des traitement par les pesticides (Hossainet *al.*, 2013). L'incidence enregistrée est de 16.67% après un traitement par *T. harzianum*, 15,47% par le traitement *Azerdicaindica* et 13.09% après un traitement combiné *T. hazianum*+extrais *d'Azerdica indica* comparés avec le contrôle sans traitement 22.61%.

Une augmentation de l'efficacité des traitements combinés à base de bactérie et extrais botanique comparés par le traitement unique contre *Fusariumoxysporum* f. sp. *cubense* à été constaté (Akilaet *al.*, 2011). Les résultats obtenus indiquent des taux de diminution environ 9% par le traitement extrais botanique, 37–45% avec le traitement avec les agents biologiques et plus de 63% de réduction avec le traitement combiné.

Dans le même ordre des idées, Muthukumar *et al.* (2010) ont rapportés l'augmentation de niveau de protection de *Capsicum annum* contre *Pythium aphanidermatum* en traitements associés des agents de lutte biologique et extrais de plantes comparé avec le traitement individuel. Le traitement des semences par les extrais *d'Allium cepa* L. et *Allium sativum* L, *T. viride* et les extrais+*T. viride* en traitement combiné ont diminué significativement l'incidence de la maladie avec des fréquences de 36.8, 37.3 et 44.9%, respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Adandonon *et al.* (2006). Toutefois, le traitement des semences par l'extrait de *Moringa oleifera* combinée avec le *Trichoderma* a entraîné une augmentation de niveau de protection environ avec environ 72% de l'espèce *Vigna unguiculata* contre *Sclerotium rolfsii*, avec une augmentation significative du rendement sur le terrain. Cependant, ce niveau est supérieur à 52% après le traitement avec l'extrait de *Moringaoleiferaet* de 53.57 % après le traitement par *Trichoderma sp* en traitements individuels.

Abdel-Kader *et al.* (2011) suggèrent que l'application de l'huile essentielle de thym sur les semences de la fève, dans des sols traités préalablement avec *T. harzianum* en traitement intégrés réduit significativement l'incidence de la pourriture racinaire provoquée par le complexe *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* et *Macrophomina phaseolina*. Les taux de réduction sont de l'ordre de 19.4% après un traitement avec l'huile de thym, 41.4% après un traitement combiné *T. harzianum*+huile essentielle de thym.

Les travaux de Zamani-Zadeh *et al.* (2014) témoignent nos résultats. Les traitements combinés de fraise avec *Lactobacillus plantarum* + l'huile de cumin (50 uL/L) et *Lactobacillus plantarum*+ l'huile de thym (100 uL/L) a entraîné une amélioration remarquable de niveau de protection contre les infections de *Botrytis cinerea*, en comparaison avec l'application de *Lactobacillus plantarum* ou l'huile essentielle en traitement individuels.

Des résultats contradictoires ont été obtenus par Abo-Elyousret *et al.* (2014). Ces travaux indiquent que le traitement par l'huile de thym a montré une grande efficacité sur le flétrissement environ 83.3% comparé avec le traitement combiné *Glomus mosseae*+huile de thym 72.2%.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de cette recherche expérimentale, nous a permis de mettre en évidence l'efficacité potentielle des huiles essentielles des deux plantes aromatiques à savoir *T. pallescens* et *C. citratus*, ainsi que les agents de lutte biologique des *Trichoderma* vis-à-vis le Foc *in vitro* et *in vivo* en traitement individuels et associées sur le flétrissement vasculaire afin d'analyser leurs effet sur les mécanismes de la résistance des plantes de pois chiche.

Les résultats *in vitro* indiquent que les huiles essentielles HEs ont exercé une importante activité inhibitrice de la sporulation et la germination des spores contre le Foc et les espèces *T. spp1* et *T. spp2* apparaît plus résistants aux huiles essentielles que le Foc.

La croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies de Foc ont été totalement inhibés à la concentration 10 et 15µL/ml. Ainsi que l'activité inhibitrice des espèces de *Trichoderma* est fortement influencée par les deux huiles essentielles aux concentrations 10 et 15µl/ml.

Les zones d'inhibitions dont les valeurs faibles sont notées chez *Trichoderma spp1* et la plus élevée a été notée chez *Trichoderma spp2* ont marqués environ 83.18 et 88.97%, respectivement.

A cet effet, l'huile essentielle de *T. pallescens* a montré une inhibition totale de la croissance mycélienne avec les concentrations 15, 10 et 5 µL/mL. Cependant, la zone d'inhibition elle est supérieure à 56.85% par les concentrations 2 et 1 µL/mL. Ces dernières se sont montrées plus sensible à la concentration 15, 10 et 5 µL/mL, dont elle a été suffisante pour arrêter leur croissance avec un taux de 100%. En outre, les deux concentrations 2 et 1 ont inhibé la sporulation et la germination des spores par des pourcentages de supérieurs à 65,42%. En parallèle, l'huile essentielle de *C. citratus* est plus moins efficace en comparaison avec celle de *T. pallescens*. Dans ce cadre, les deux concentrations 15 et 10 µL/mL ont montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, alors que les concentrations 5, 2 et 1 µL/mL ont manifesté des zones d'inhibition variable entre 10,5 et 42.57%.

Le teste de Confrontation par contact direct et indirect ont montré une activité inhibitrice et une efficacité très remarquable de l'espèce de *Trichoderma* contre le Foc qui indique une diminution de la valeur de l'AUDPC.

L'association des traitements a également indiquée une diminution plus importante de la sévérité de la maladie comparée avec le traitement unique avec les antagonistes ou avec les huiles essentielles.

Ce modeste travail constitue les bases d'un travail à poursuivre et à améliorer pour une étude beaucoup plus approfondie qui pourra faire l'objet d'une thèse de doctorat.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel-Kader M.M., El-Mougy, N.S., Aly M.D.E., Embaby, E.I. (2011). Occurrence of Sclerotinia Foliage Blight Disease of Cucumber and Pepper Plants under Protected Cultivation System in Egypt II. Bio-Control Measures against Sclerotinia Spp. in Vitro. *Advances in Life Sciences*, 1(2): 59-70.
- Abdel-Kader, M.M., Abdel-Kareem, F., El-Mougy, N.S., El-Mohamady, R.S. (2013). Integration between Compost, *Trichoderma harzianum* and Essential Oils for Controlling Peanut Crown Rot under Field Conditions. *Journal of Mycology*,
- Abdel-Kader, M.M., El-Mougy N.S., Lashin, S.M. (2011). Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *Journal of plant protection research*, 51(3).
- Abo-Elyousr, K.A.M., Mohamed, A.A., Seleim, Abd-El-Moneem K., M.H., Frag A.S. (2014). Integrated effect of *Glomus mosseae* and selected plant oils on the control of bacterial wilt disease of tomato. *Crop Protection*, 66: 67-71.
- Adandonon, A., Aveling, T.A.S., Labuschagne, N., Tamo, M. (2006). Biocontrol agents in combination with *Moringa oleifera* extract for integrated control of *Sclerotium*-caused cowpea damping-off and stem rot. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 409–418.
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, 57: 175–183.
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., Thompson, A.K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64: 159–167.

Références bibliographiques

- Dhawan, A.K. Peshin, R. (2009). Integrated Pest Management: Concept, Opportunities and Challenges. In Dhawan, A K. and Peshin R. Integrated Pest Management: Innovation-Development Process. Volume 1. Springer Science + Business Media B.V. 2009. DOI 10.1007/978-1-4020-8992-3
- El-Mougy, N.S., Shaban, A.M.H., Abdel-Kader, M.M. (2015). Evaluation of Seed Coating with Some Essential oils and Bio-agents against Root Rot Disease of Faba Bean. International Journal of Engineering and Innovative Technology, 4(11):.
- El-Sharkawya, H.H.A., Rashad, Y.M, Ibrahim, S.A. (2018). Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and Trichoderma spp. Physiological and Molecular Plant Pathology, 103: 84–91.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. Journal of Applied Ecology, 50(4): 977–987.
- Hossain, M.D., Hossain, M., N., Sultana, F., Shah M.N.I., Md. Shaikul I., Khurshed Md.A. B. (2013). Integrated management of Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with microbial antagonist, botanical extract and fungicide. African Journal of Biotechnology, 12(29): 4699-4706.
- Jain, A., Singh, A., Singh, S., Singh, H. B. (2015). Phenols enhancement effect of microbial consortium in pea plants restrains *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control, 89: 23–32.
- McMaster, C.A., Plummer, K.M., Porter, I. J., Donald, E.C. (2013). Antimicrobial activity of essential oils and pure oil compounds against soilborne pathogens of vegetables. Australasian Plant Pathology, 42(4): 385–392.
- Monfil, V.O., Casas-Flores, S. (2014). Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. Biotechnology and Biology of *Trichoderma*, 429–453.

Références bibliographiques

-
-
- Muthukumar, A., Eswaran, A., Nakkeeran, S., Sangeetha, G. (2010). Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. *Crop Protection*, 29: 1483-1488.
- Pavela, R., Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12): 1000–1007.
- Soković, M.D., Glamočlija, J.M., Ćirić, A.D. (2013). Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides. *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. doi:10.5772/50277
- Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A.M. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth micro dilution and vapour contact methods. *J Appl Microbiol*, 102:1544–1550
- Vukovic, N., Milosevic, T., Sukdolak, S., Solujic, S. (2007) Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Evid base Compl AlternativeMed (eCAM)* 4(S1):17–20
- Zamani-Zadeh, M., Soleimanian-Zad, S., Sheikh-Zeinoddin M., Golia S.A.H. (2014). Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit Postharvest *Biology and Technology*, 92: 149–156.
- Zambonelli, A.Z, D'Aulerio, A, Bianchi, A, Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *J Phytopathology*, 144:491–494.
- Singh, A., Jain, A., Kumar Sarma, B., Upadhyay, R S., Singh, H. B., (2014). Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection. *Microbiological Research*, 169, 353–360.

Références bibliographiques

- Omomowo, O., Fadiji A. O E., Omomowo, I., (2018). Assessment of bio-efficacy of *Glomus versiforme* and *Trichoderma harzianum* in inhibiting powdery mildew disease and enhancing the growth of cowpea. *Annals of Agricultural Sciences*, 63 (1): 9-17