



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 Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
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 des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Agronomique

Spécialité : Protection des Végétaux

Intitulé :

l'Effet synergique entre les antagonistes biologiques et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* dans le contrôle intégré du flétrissement vasculaire.

Présenté par :

BOUDJEMAA *Nada* & BOUKHARI *Zakaria*

Devant le Jury :

| | Nom & Prénom | Grade | Affiliation / institution |
|-------------|--------------------|-------|---------------------------|
| Président : | Mme. Laoufi Hadjer | MAA | Université de B.B.A. |
| Encadrant : | M. Moutassem Dahou | MCA | Université de B.B.A. |
| Examineur : | M. Saifi Mounir | MCA | Université de B.B.A. |

Année Universitaire 2023/2024

Remerciements :

La réalisation de ce mémoire de fin d'études a été une aventure riche en défis, mais aussi en accomplissements. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui nous ont soutenus et accompagnés tout au long de ce parcours.

Nos premiers remerciements vont à Dahou Moutassem, notre encadrant de mémoire, pour son encadrement éclairé et bienveillant. Ses conseils avisés, sa rigueur scientifique et sa grande disponibilité ont été des atouts inestimables pour mener à bien ce projet. Nous le remercions sincèrement pour la confiance qu'il nous a accordée en nous confiant ce sujet passionnant.

Nous exprimons également notre reconnaissance aux membres du jury : Madame Laoufi Hadjer et Monsieur Saifi Mounir ; qui nous font l'honneur d'évaluer ce travail. Leurs expertises reconnues et leurs regards critiques permettront, nous n'en doutons pas, d'enrichir davantage cette recherche.

Nos remerciements vont aussi à tous les enseignants du département des sciences agronomiques.

Cette expérience restera pour nous deux une étape marquante de notre parcours, mais aussi le souvenir d'un accomplissement collectif grâce au soutien inestimable de tous.

Dedication :

Last but not least, i wanna thank me, i wanna thank me for believing in me, i wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for never quitting, I wanna thanks me for always being a giver and tryna give more than I receive, I wanna thank me for tryna do more right than wrong, I wanna thank me for just being me at all the time <3.

To my beloved family:

Your steadfast love, belief, and support

Sustained me through this challenging journey.

This accomplishment stands as a testament to your selflessness.

I am forever indebted to you.

NADA.

Dedication:

To my beloved mother, whose memory guides me every day. Your love and wisdom continue to be my source of strength. You are deeply missed and forever cherished.

To my beloved father, may God protect you and maintain your health and well-being.

To my brothers and sisters, Ahlam Ilyes, Leila, Billel ,Hadjer and all their children's

To my little sister Maroua, may God grant her good health.

To all my friends especially Rabeh, Hani, Abdellatif, Abdennour, haithem, Dhayo, Houssam, Oussama, Achwak, Nesrine, Nada, Fadoua, mohammed, bilal.

Zaki.

Étude de l'effet synergique entre les antagonistes biologiques et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Dans le contrôle intégré du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L.).

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet synergique entre l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* en association avec des espèces de *Trichoderma sp*, pour envisager une lutte biologique intégrée. Dans les essais *in vitro*, l'huile essentielle de *T. vulgaris* a inhibé la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies du Foc avec des intervalles d'efficacité variable entre 51.33 et 100 %, 75.30 jusqu'à 100 % et entre 82.46 et 100 %, respectivement. L'ensemble des espèces de *Trichoderma sp* ont marqué des zones d'inhibition de la croissance mycélienne de 68,76 % à 77,35 % pour le test direct et de 14,27 % à 38,22 % pour le test indirect. Par ailleurs, l'association huile essentielle/*Trichoderma spp* expose des modifications parfois profondes sur l'aspect morphotypique et le comportement antagoniste des souches fongiques. Toutefois, un synergisme significativement négatif a été constaté avec des concentrations supérieures à 10 µL. Par contre, la zone d'inhibition a été augmentée avec des fréquences variables entre 0.11 et 27.02 % pour les tests directs par les concentrations faibles, dénonçant un synergisme positif. Les traitements *in vivo* montrent que les valeurs de l'AUDPC enregistrées chez les plantules de pois chiche traitées par l'huile essentielle exposent une diminution de la sévérité de la maladie entre 65.45 et 96,81 %, dont l'efficacité est dose dépendante : elle augmente avec l'augmentation de la concentration. Cependant, les valeurs notées chez celles traitées par les *Trichoderma sp* sont plus ou moins supérieures et sont variables, exposant une diminution de la gravité variable entre 48,48 % et 88,63 %. Par ailleurs, un effet synergique très remarquable a été constaté en traitement associé de l'huile essentielle avec les *Trichoderma in vivo* en comparaison avec les traitements individuels, où une augmentation de la diminution de la sévérité de la maladie a été constatée avec des taux de diminution variables entre 56,92 et 70,76 %. La lecture des résultats indique une augmentation significative des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes chez les plantules ayant reçu les traitements, dont l'augmentation varie selon le traitement. Les huiles essentielles interagissent d'une manière synergique avec les agents biologiques, améliorant par conséquent le contrôle biologique du Foc.

Mots-clés : Synergisme *Fusarium oxysporum* F. sp. *Ciceris*, *Trichoderma sp.*, huile essentielle, *T. vulgaris*.

دراسة الفعل المتكامل بين الزيت الأساسي *Thymus vulgaris* و العوامل البيولوجية في مكافحة المتكاملة للبول الوعائي لنبات الحمص (*Cicer arietinum.L*).

المخلص:

يهدف هذا البحث إلى دراسة التأثير التكاملي بين الزيت الأساسي لنبات الزعتر بالتعاون مع أنواع من فطر *Trichoderma sp*. من أجل احداث مقاومة البيولوجية المتكاملة. أظهر الزيت الأساسي للزعتر فعالية في تثبيط نمو وتكاثر فطر Foc بنسب تفاوتت بين 51.33% و 100%، ومن 75.30% إلى 100%، ومن 82.46% إلى 100% في التبوغ وانتاش الابواغ على التوالي. أظهرت جميع أنواع فطر *Trichoderma sp* مناطق لتثبيط نمو الفطر بنسب تراوحت بين 68.76% و 77.35% في الاختبار المباشر، ومن 14.27% إلى 38.22% في الاختبار غير المباشر. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الجمع بين زيت الزعتر الأساسي و *Trichoderma spp* تغيرات في المظهر والسلوك المضاد لسلاسل الفطر. ورغم ذلك، لوحظ تأثير سلبي كبير عند التركيزات العالية لزيت الزعتر. وعلى الجانب الآخر زادت مناطق التثبيط بنسب تراوحت بين 0.11% و 27.02% في الاختبارات المباشرة باستخدام التراكيز المنخفضة، مما يشير إلى وجود تأثير إيجابي. في التجارب على النباتات، أظهرت معاملات AUDPC للشتلات المعالجة بزيت الزعتر انخفاضاً في شدة المرض بين 65.45% و 96.81%، مع زيادة التأثير مع زيادة التركيز. ومع ذلك، كانت القيم الملاحظة في الشتلات المعالجة بـ *Trichoderma sp* أعلى بشكل متفاوت، مع انخفاض في شدة المرض بين 48.48% و 88.63%. ولوحظ تأثير تآزري بارز جداً في المعالجة المشتركة بين زيت الزعتر الأساسي و *Trichoderma* في التجارب على النباتات، مما أدى إلى زيادة في انخفاض شدة المرض بنسب تراوحت بين 56.92% و 70.76%. وأظهرت نتائج الدراسة زيادة كبيرة في محتويات البوليفينول والفلافونويد في الشتلات التي تلقت المعالجات، مع تفاوت في الزيادة حسب نوع العلاج. تفاعلت الزيوت الأساسية بشكل تآزري مع العوامل البيولوجية، مما يعزز السيطرة البيولوجية على فطر Foc.

الكلمات المفتاحية: التأثير التآزري، زيت الزعتر الأساسي، *Trichoderma spp*، *Fusarium oxysporum f.*

(*sp. Ciceris* (Foc)، مكافحة البيولوجية المتكاملة

Study of the synergistic effect between biological antagonists and the essential oil of *Thymus vulgaris* in the integrated control of vascular wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Abstract:

The objective of this study is to evaluate the synergistic effect between the essential oil of *Thymus vulgaris* in association with species of *Trichoderma sp.*, to consider an integrated biological control strategy. In in vitro test, essential oil of *T. vulgaris* inhibited the mycelial growth, sporulation and conidial germination of *Foc* with variable efficacy ranges between 51.33 and 100%, 75.30 up to 100% and between 82.46 and 100%, respectively. All species of *Trichoderma sp.* marked zones of inhibition of mycelial growth from 68.76% to 77.35% for the direct test and from 14.27% to 38.22% for the indirect test. Moreover, the association of essential oil/*Trichoderma spp.* exposes sometimes profound modifications on the morphotypic aspect and antagonistic behavior of the fungal strains. However, a significantly negative synergism was observed with concentrations higher than 10 μ L. On the other hand, the inhibition zone was increased with variable frequencies between 0.11 and 27.02% for the direct tests by the low concentrations, denouncing a positive synergism. *In vivo* treatments show that the AUDPC values recorded in chickpea seedlings treated with the essential oil show a decrease in disease severity between 65.45 and 96.81%, whose efficacy is dose-dependent: it increases with increasing concentration. However, the values noted in those treated with *Trichoderma sp.* are more or less higher and variable, showing a variable decrease in severity between 48.48% and 88.63%. Moreover, a very remarkable synergistic effect was observed in the associated treatment of the essential oil with *Trichoderma* in vivo compared to individual treatments, where an increase in the decrease in disease severity was observed with variable decrease rates between 56.92 and 70.76%. The reading of the results indicates a significant increase in polyphenol and flavonoid levels in seedlings that received treatments, with the increase varying according to the treatment. Essential oils interact synergistically with biological agents, consequently improving the biological control of *Foc*.

Keywords: Synergism *Fusarium oxysporum* F. sp. *Ciceris*, *Trichoderma sp.*, essential oil, *T. vulgaris*.

TABLE DES MATIERES

| | |
|-------------------------------|----------|
| Remerciement | |
| Dédicaces | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| 1. Introduction..... | 1 |

CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES

| | |
|--|-----------|
| 2.1.1. Matériels végétales..... | 3 |
| 2.1.2. Matériels fongiques..... | 3 |
| 2.1.3 Isolement, Purification et culture monospore | 3 |
| 2.2 Identification des Trichoderma..... | 4 |
| 2.2.1 Macroscopique..... | 4 |
| 2.2.2 Microscopique..... | 4 |
| 2.3. Test antagoniste des espèces de Trichoderma in vitro | 5 |
| 2.3.1. Test de Confrontation par contact direct..... | 5 |
| 2.3.2 Test de Confrontation par contact indirect..... | 5 |
| 2.4. Effet des huiles essentielles sur le Foc et le Trichoderma in vitro.... | 5 |
| 2.4.1. Extraction, formulation et effet des huiles essentielles | 5 |
| 2.4.2. Effet antifongique des huiles essentielles sur le Foc et le Trichoderma..... | 6 |
| 2.4.3. Effet des huiles essentielles sur l'activité antifongique de Trichoderma spp.... | 6 |
| 2.5. Activité antifongique in vivo | 8 |
| 2.5.1. Préparation de l'inoculum du FOC et inoculation de substrat..... | 8 |
| 2.5.2. Préparation des huiles essentielles et pulvérisation de substrat..... | 8 |
| 2.5.3. Préparation et traitements des plantules de pois chiche par Trichoderma..... | 9 |
| 2.5.4 Traitements individuels et intégrés | 9 |
| 2.5.5 Analyse de l'effet des HEs sur le taux des polyphénols et des flavonoïdes..... | 10 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.6. Exploitation des résultats et analyses statistiques | 10 |
|---|-----------|

CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|-----------|
| 1. Résultats..... | 12 |
| 1.1. Résultats des isolements..... | 12 |
| 1.2. Efficacité des huiles essentielles in vitro..... | 13 |
| 1.3. Effet antagonistes des Trichoderma contre le Foc..... | 14 |
| 1.3.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture..... | 14 |
| 1.3.2. Confrontation par contact indirect sur milieu de culture..... | 16 |
| 1.4. Effet des huiles essentielles de T. vulgare sur l'activité antifongique des Trichoderma..... | 17 |
| 1.4.1 Effet des huiles essentielles sur la fusariose..... | 18 |
| 1.5. Effet des espèces de Trichoderma sur la fusariose..... | 20 |
| 1.6. Effet des traitements associés sur la fusariose vasculaire du pois chiche..... | 21 |
| 1.7. Effet des différentes combinaisons sur la teneur en polyphénols et en flavonoïdes..... | 21 |
| Discussion..... | 24 |
| Conclusion..... | 35 |
| Références bibliographiques..... | 37 |

LISTES DES FIGURES

| | |
|--|-----------|
| Figure 1. Représentation schématique de la technique adoptée pour analyser l'effet des huiles essentielle sur <i>Trichoderma</i>..... | 7 |
| Figure 2. Matériels fongiques utilisés dans cette étude..... | 12 |
| Figure 3. Efficacité de l'huile essentielle de <i>T.vulgaris</i> contre le Foc..... | 13 |
| Figure 4. La confrontation directe entre le Foc et les <i>Trichoderma</i>..... | 15 |
| Figure 5. présentation des résultats de test de confrontation direct des trichoderma contre le Foc. les lettres a, b et...représent le niveau de signification au seul de 5% | 15 |
| Figure 6. La confrontation indirecte entre <i>Trichoderma sp</i> et le FOC | 16 |
| Figure 7. Présentation des résultats de test indirecte des espèces de <i>Trichoderma</i> contre le Foc. Les lettres a, b et... représentent le niveau de signification au seul de 5%..... | 16 |
| Figure 8. Effet des traitements par les huiles essentielles de <i>T. vulgaris</i> sur l'activité inhibitrice des espèces de <i>Trichoderma</i> contre le Foc | 18 |
| Figure 9. Efficacité de l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> contre le Foc in vivo..... | 19 |
| Figure 10. Résultats des traitements par les différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>. 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%..... | 19 |
| Figure 11. Efficacité des espèces de <i>Trichoderma</i> contre le Foc in vivo..... | 20 |
| Figure 12. Efficacité des espèces de <i>Trichoderma</i> sur la fusariose vasculaire in vivo. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétition \pm ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seul de 5%..... | 20 |
| Figure 13. Sévérité des symptômes de flétrissement vasculaire sur les plantules de pois chiche | 21 |
| Figure 14. Résultats des traitements combinés. Les données sont les moyennes de 3 répétitions de taux des poly phénols ou des flavonoïdes \pm ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à $p<0.05$..... | 21 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1. Espèces de Trichoderma isolées à partir de Thymus vulgaris..... | 12 |
| Tableau 2. L'effet de l'huile essentielle de T.vulgaris contre le Foc 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 seuil de 5..... | 13 |
| Tableau 3 . Effet des traitements par les huiles essentielles de T. vulgaris sur l'activité inhibitrice des espèces de T. vulgaris sur l'activité inhibitrice des espèces de Trichoderma contre Foc..... | 18 |
| Tableau 4. Variation quantitative des teneurs en poly phénols et des flavonoïdes chez les plantules traitées avec les différentes combinassions. Les données sont les moyennes de 4 répétitions de taux du poly phénols ou des flavonoïdes \pm ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à $p < 0.05$..... | 23 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ANOVA : analyse de variance

AUDPC : area UNDER the curve progressing of the disease

°C : degrés Celsius

Cm : centimètre

DI : Incidence

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

Foc : *Fusarium oxysporum*

G : gramme

I : indice d'inhibition

ISM : L'indice de sévérité moyenne

CCLS : COOPÉRATIVE DES CÉRÉALES & DES LÉGUMES SECS

Kg : kilogramme

MGI : Mycelial growth inhibition

ML : millilitre

PDA : Potato dextrose agar

PDB : Potato dextrose broth

PPM : partie par million

S : sévérité

SAS : Statistical Analysis System

GLM : General Liner Model.

ZI : Zone d'inhibition

INTRODUCTION

Le flétrissement vasculaire causé par *Fusarium oxysporum f.sp. Ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato (Foc) est la maladie la plus importante sur la culture de pois chiche (*cicer areitenum L.*). Ce pathogène provoque des dégâts très considérables qui varient entre 10 à 15 % et peuvent détruire complètement la récolte dans les conditions favorables au développement de la maladie (Navas-Cortes *et al.*, 2000, Moutassem, 2020, Muche et Yemata, 2022).

En Algérie, cette maladie rapportée pour la première fois par Bouznad *et al.* (1990) est considérée parmi les maladies les plus importantes sur le pois chiche où des prospections réalisées dans les différentes régions du pays ont révélé la forte présence de cette maladie. Dans le Nord du pays, 20-45 % des champs prospectés sont affectés par la fusariose du pois chiche (Moutassem *et al.*, 2018, Moutassem *et al.*, 2019, Moutassem, 2020).

L'utilisation de composés chimiques en agriculture a donné des résultats positifs contre un large éventail d'agents pathogènes qui affectent les cultures. Cependant, les préoccupations ont survécu en raison de la sensibilité décroissante des maladies à la lutte chimique, des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine, ainsi que de l'apparition des souches résistantes à un ou plusieurs pesticides (Monfil et Casas-Flores, 2014, Saldaña- Mendoza *et al.*, 2023).

De nos jours, différentes biomolécules d'origine microbienne et végétale ont été formulées pour une application à grande échelle et sont utilisées comme des alternatives aux pesticides dans le contexte d'une protection écologique des cultures (Moutassem *et al.*, 2018, Moutassem *et al.*, 2019).

Dans la recherche des méthodes de lutte alternatives, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. L'activité antifongique associée aux huiles essentielles est formellement effectuée grâce à sa richesse en composés phénoliques et terpinoidiques connus par leurs effets antimicrobiens testés dans sa forme pure (Akdeniz and Kesimci, 2024, Nie *et al.*, 2024).

Bien qu'ils soient très efficaces en raison de ces potentiels principes actifs, il n'existe qu'un nombre limité de produits à base d'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 composées sont très concentrées en principes actifs et peuvent avoir une toxicité élevée vis-à-vis des microorganismes non cibles et même peuvent affecter la plante en cas d'utilisation avec des concentrations élevées (Pavela et Benelli, 2016).

Les espèces fongiques appartenant au genre *Trichoderma spp* ont été bien documentées comme agents de lutte biologique efficaces contre les maladies causées par les maladies telluriques (Saldaña- Mendoza *et al.*, 2023) et compris le Foc (Moutassem *et al.*, 2020,

Pradhan et al., 2022). Ces espèces fongiques sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines des plantes (**Monti et al., 2020, Poveda et al., 2020, Venkataramanamma et al., 2022**). Malgré leur potentielle efficacité contre beaucoup de phytopathogènes, les produits à base de *Trichoderma spp* présentent de nombreux inconvénients, incluant la durée de vie limitée, l'efficacité avec une forte dose, une faible efficacité contre les agents pathogènes telluriques et la stabilité dans un environnement défavorable (**Keswani et al., 2014**).

Généralement, un programme de lutte efficace contre les maladies provoquées par les phytopathogènes exige l'application de plusieurs mesures (**VenkataramanAMMA et al., 2023**). La lutte intégrée est un système de protection qui prend en faveur la préservation de l'environnement et la santé du consommateur, elle correspond à l'association de l'ensemble des méthodes de lutte (**Venkataramanamma et al., 2023**). L'utilisation de différentes approches dans le contrôle 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, Poveda et Eugui, 2022**).

L'application de synergies utilisant les agents de lutte biologique (BCA) et les huiles essentielles pour contrôler les stress des cultures est rarement explorée. Cependant, peu de 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, sachant que les différents antagonistes abritent avec le pathogène la même niche écologique. Dans ce contexte, l'application des huiles essentielles pose un problème : c'est que ces dernières affectent la flore antagoniste de la même façon que les pathogènes.

C'est dans ce contexte que l'objectif de la présente étude est de déterminer l'efficacité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, les agents de lutte biologique appartenant au genre *Trichoderma*, en traitements individuels et associés pour envisager une lutte biologique intégrée contre le Foc.

Le présent travail est réparti en deux chapitres, le premier est un aperçu sur l'ensemble des techniques et méthodologies adoptées pour la réalisation des expérimentations. La dernière partie décrit et discute les résultats acquis. La conclusion générale et les perspectives qui en découlent clôtureront ce manuscrit.

CHAPITRE I.

MATERIEL ET METHODES

2. Matériel et méthodes

L'objectif de cette étude est de déterminer l'efficacité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les agents de lutte biologique représentés par les espèces appartenant aux Trichoderma en traitements individuels et combinés pour envisager une lutte biologique intégrée contre le Foc.

2.1. Matériels biologiques utilisés

2.1.1. Matériels végétales

Le cultivar de pois chiche utilisé dans cette étude est représenté par la variété ILC 32-79 connue par sa sensibilité au *Fusarium oxysporum f.sp.Ciceris*. Cette variété nous a été fournie par l'Institut technique des grandes cultures (CCLS) de Bordj Bou Arreridj.

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de la partie aérienne de *Thymus vulgaris*. Les plantes tests ont été récoltées à partir de la région Mascara le mois d'avril de l'année 2023.

2.1.2. Matériels fongiques

Le pathogène *Fusarium oxysporum f.sp.Ciceris* (Foc) utilisé dans cette a été isolé à partir des plantes malades présentant des symptômes de jaunissement vasculaire de pois chiche originaire de la région de Mascara. L'isolat est un pathotype de jaunissement d'un morphotype cotonneux rose et représente un caractère très agressif. Un test de pathogénicité a été effectué sur l'isolat selon le protocole de :

2.1. Isolement, Purification et culture monospore

Les Trichoderma ont été obtenus, par isolement direct, à partir du sol rhizosphérique et les la partie aérienne de *Thymus vulgaris* selon la méthode décrite par **Rapilly (1968)**. Les échantillons du sol ont été préalablement séchés, broyés et calibrés par tamisage.

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère en ajoutant 1g du sol ou de la plante broyée à 9 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation pendant 10 min. Cette solution a servi pour préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 10 ml de la solution à 9 ml d'eau distillée stérile jusqu' à l'obtention de la dilution de 10⁻³.

Au moment de l'analyse, 1 ml de chaque dilution sont versés dans un tube à essai contenant 9 ml du milieu d'isolement sélectif à base de rose bengal, maintenu en surfusion au bain-marie entre 37° et 40C°. Le contenu des tubes à essai a été versé dans des boites de pétri stérile bien homogénéisées par agitation manuelle par un mouvement circulaire sur plan horizontal. Les boites ont été incubées à 28±3C° pendant six jours (**botton et al, 1990**).

Les microorganismes isolés sont d'abord purifiés par deux ou trois repiquages successifs. A partir des cultures âgées de 7 jours du champignon, une suspension de spores a été préparée dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile à la base de 20 spores / ml. Une goutte de chaque suspension est prélevée et étalée de manière uniforme sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes sont ensuite incubées à la température ambiante $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. Après 24h, un prélèvement d'une spore germée est effectué sous une loupe binoculaire, et repiqué dans des boîtes contenant le milieu PDA. Les boîtes ont été mises à incuber pendant 7 jours à 28°C (**Hammill, 1974**).

3.2.2 Identification des *Trichoderma*

Après deux semaines d'incubation, le comportement de chaque thalle issu de la germination des spores est observé (aspect du mycélium et pigmentation). Si tous les thalles présentent des caractères morphologiques identiques entre eux et à ceux de la culture mère, un seul est choisi pour constituer le clone représentatif de l'isolat de départ. En revanche. Si différents types morphologiques apparaissent dans les colonies d'un même isolat, ils sont tous conservés comme tête de clone, étant représentatifs d'une morphologie donnée et d'une éventuelle diversité génétique de l'isolat original.

3.2.2. Macroscopique

L'analyse macroscopique porte essentiellement sur les caractères culturels, la forme des colonies (arrondie, rayonnante...), l'aspect du mycélium aérien (dense, poudreux...), la couleur de la colonie dépendant fréquemment du milieu utilisé, la sporulation, ainsi que le revers de la culture qui donne une idée sur la pigmentation du milieu.

3.2.2. Microscopique

L'identification des espèces est réalisée par observation des caractères microscopiques sous microscope optique (mycélium). Conidiophores, conidiogenèse, conidies, structures de résistance, éventuellement forme sexuée..., après une série de repiquages successifs jusqu'à purification du champignon, en utilisant le bleu de coton comme liquide de montage et en se référant à différentes clés de détermination : **Gilman (1957)** ; **Barnett (1960)** ; **Ellis (1971)** ; **Ellis (1976)** ; **Domsch *et al.* (1980)**.

2.2. Test antagoniste des espèces de *Trichoderma in vitro*

2.2.2. Test de Confrontation par contact direct :

L'activité antagoniste des isolats obtenus de *Trichoderma* vis-à-vis le Foc a été étudiée selon la technique décrite par **Benhamou et Chet (1996)**. Elle consiste à co-ensemencer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélosées de 5 mm de diamètre, l'une portant le *Trichoderma sp* et l'autre le Foc. Les deux pastilles ont été placées suivant un axe diamétral à 4 cm et à équidistance du centre de la boîte. L'incubation est réalisée à 28 ± 3 C pendant huit jours. Le témoin est constitué par le pathogène uniquement, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. 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.

Une observation de la zone de contact entre les deux protagonistes afin d'élucider le mode d'action des antagonistes.

3.2.3. Test de Confrontation par contact indirect

L'inhibition fongique grâce à la production des substances volatiles par les isolats de *Trichoderma* a été mesurée selon la méthode décrite par **Dennis et Webster (1971)**. À partir des cultures âgées de 7 jours des protagonistes, une pastille gélosée de 5 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et placée séparément au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Après l'enlèvement des couvercles aseptiquement, la boîte de Pétri ensemencée avec le pathogène est placée au-dessus de celle qui contient le *Trichoderma*. Les deux fonds adhésés sont fermés par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. Pour le témoin, le même assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes. Le fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque traitement.

Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur le milieu de culture. 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.

2.4. Effet des huiles essentielles sur le Foc et le *Trichoderma in vitro*

2.4.1. Extraction, formulation et effet 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**). Une quantité de 100 g

de la part aérienne de chaque plante a été versée dans un ballon de 500 ml et imprégnée d'eau distillée stérile. L'ensemble a été porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures. L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon à l'abri de la lumière fermé hermétiquement à 4 °C.

Les huiles essentielles ont été formulés par le Tween 80 à 3 %. Les deux huiles essentielles ont été testées avec des concentrations de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, et 1 µl/ml.

2.4.2. Effet antifongique des huiles essentielles sur le Foc et le *Trichoderma*

La détermination de la sensibilité de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination de Foc à l'huile essentielle a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu gélosé décrite.

Les huiles déjà formulées par le Tween 80 (3 %) ont été additionnées dans des flacons contenant un milieu PDA maintenu en surfusion dans un bain-marie réglé à une température de 55 °C. Après agitation, des flacons, le milieu formulé par l'huile essentielle a été coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

L'inoculation se fait par le dépôt au centre de la boîte d'un disque du mycélium d'environ 0,5 cm de diamètre d'une pré-culture de 8 jours. Une boîte de Pétri contenant le milieu PDA sans huile essentielle est inoculé pour servir de témoin. Cinq répétitions ont été retenues pour chaque concentration, y compris le témoin. Après incubation à 28 ± 3 C pendant 8 jours. La croissance mycélienne a été estimée en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture.

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 stériles. Le nombre de spores pour chaque échantillon est compté par la cellule de Mallassez sous le microscope optique.

2.4.3. Effet des huiles essentielles sur l'activité antifongique de *Trichoderma spp*

La méthode de contact direct est utilisée en vue de déterminer l'effet des huiles essentielles sur l'activité antifongique des *Trichoderma* contre le Foc selon la méthode de diffusion en milieu gélosé décrite précédemment.

Cette technique consiste à l'amendement de 100 ml de milieu de culture PDA avec des concentrations de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5, et 1 µl/ml de l'huile essentielle. Le milieu empoisonné est coulé dans des boîtes de pétri en verre de 9 cm de diamètre.

Cette expérience a été procédée par la disposition de des antagonistes et du pathogène en association dans des boites de pétri. L'inoculation de Foc se fait par le dépôt au centre de la boite d'un disque du mycélium d'environ 0,5 cm de diamètre d'une pré-culture de 8 jours. Des pustules de même diamètre de *Trichoderma* ont été disposées dans la même boite avec une distance de 3,5 cm de fragments de Foc. Ces boites ont été celées avec le parafilm pour éviter toute évaporation de l'huile essentielle (Figure 1).

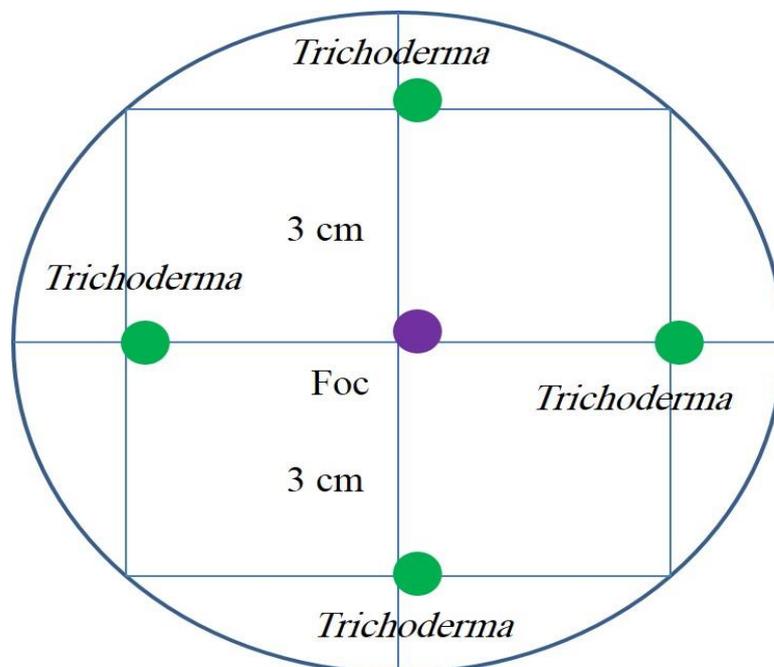


Figure 1. Représentation schématique de la technique adoptée pour analyser l'effet des huiles essentielles sur *Trichoderma*.

Une boîte de pétri contenant 20 ml de milieu PDA sans huile essentielle est inoculée séparément par le Foc, *Trichoderma sp* pour servir comme témoins. Les boîtes traitées et non traitées sont incubées à 25 ± 3 C pendant 8 jours.

La croissance mycélienne a été estimée quotidiennement en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture. Le pourcentage d'inhibition I (%) a été déterminé par rapport au témoin et calculé selon la formule de Leroux et Gredet (1978) :

$$X(\%) = \frac{X_c - X_t}{X_c} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

X : Croissance mycélienne moyenne dans le milieu sans traitement (témoin).

X_i : Croissance mycélienne moyenne dans le milieu en présence de l'extrait.

2.5. Activité antifongique *in vivo*

2.5.1. Préparation de l'inoculum du FOC et inoculation de substrat

La préparation de l'inoculum de Foc a été effectuée selon la technique de **Jimenez-Gasco et al. (2001)**. La technique consiste à mettre dans des sacs en plastique autoclavables contenant un mélange de sable tamisé et ajouté à la farine de maïs humidifiée par l'eau distillée, selon la proportion de 9/1/1. Le mélange est stérilisé deux fois à l'autoclave à 121° C pendant 30 min, puis ensemencé par 10 explants de 5 mm de diamètre prélevés à partir d'une culture de Foc âgée de 15 jours. Le mélange ensemencé par le Foc est incubé à 25 °C pendant 21 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 100 g d'inoculum pour 1 kg de substrat. Ce dernier est composé d'un mélange de sable, terre et terreau selon les proportions respectivement de 1/1/1 stérilisé à 121°C pendant 24 h.

2.5.2. 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. pallezens* ont été formulées avec le tween 80 (3 %) de façon à obtenir la concentration 0,5, 0,25 et 0,1 µL/ml. Ces dernières ont été transférées dans des dispositifs de pulvérisation produisant des gouttelettes très fines. Cette formulation a été pulvérisée sur le substrat inoculé par le Foc à raison de trois applications avec un intervalle de 48 h (**Kamdi et al., 2012**). Les pots traités par les huiles ont été couverts par un papier aluminium stérile disposé dans une chambre ambiante pour assurer une meilleure efficacité des traitements.

En pré-germination, des grains de pois chiche de la variété Guab 5 ont été effectués. Les grains mis en germination ont été préalablement désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium (1 %), lavés dans de l'eau distillée stérile, séchés entre deux papiers filtres, puis installés dans des boîtes de pétri contenant des papiers filtres stériles et incubés 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 immergées dans les formulations des huiles essentielles à base de *T. pallezens* et *C. citratus* pendant 30 min. Après son immersion, les plantules ont été transférées dans des pots contenant un substrat déjà inoculé.

2.5.3. Préparation et traitements des plantules de pois chiche par *Trichoderma*

La suspension sporale a été préparée selon la méthode de **Calvet *et al.* (1990)**. L'effet des huiles essentielles sur la germination des conidies de Foc a été évalué selon la procédure décrite par. 5 fragments mesurant 0,5 mm de diamètre ont été inoculés dans des erlenmeyers contenant 200 ml de PDB stérilisé préalablement à 105°C pendant 20 min. Ces derniers ont été incubés à 25 °C pendant 8 jours. Après filtration, la suspension de spores a été ajustée à 10⁶ spores/ml. Les graines de la variété sensible Guab 5 désinfectées à l'hypochlorite de sodium (1 %), rincées à l'eau distillée stérile et séchées entre deux papiers filtres stériles ont été trempées dans une suspension sporale ajustée à 5 x 10⁸ du *T. viride* et *T. harzianum* pendant 30 min (**Harman, 1991**). Les graines enrobées par les deux antagonistes ont été mises dans des boîtes de pétri stériles contenant deux couches de papier filtre stérile, soigneusement imbibées par de l'eau distillée stérile et incubées à 25 °C pendant 72 h.

2.5.5. Traitements individuels et intégrés

a- Traitement individuels

Les traitements individuels effectués durant cette étude sont :

1- Huiles essentielles de thym avec les concentrations de 5, 2.5 et 1.

B traitement intégrée :

Dans le but de mettre en évidence l'efficacité du traitement intégré, les semences de pois chiche inoculées précédemment par les espèces de *Trichoderma* ont été semées dans les pots contenant un substrat déjà traité avec les huiles essentielles de *T. vulgaris* selon les combinaisons suivantes :

Traitement (SG1) : *Trichoderma* + huile essentielle de thym (2.5 %).

Traitement (SG 2) : *Trichoderma* + huile essentielle de thym (2.5 %).

Traitement (SG 3) : *Trichoderma* + huile essentielle de thym (2.5 %).

Traitement (SG 4) : *Trichoderma* + huile essentielle de thym (1 %).

Traitement (SG 5) : *Trichoderma* + huile essentielle de thym (1 %).

Traitement (SG 6) : *Trichoderma* + huile essentielle de thym (1 %).

Traitement (T-) : pas d'inoculum + les semences traitées avec le Tween 80 (3 %) + eau distillée stérile.

Le substrat traité a été mis à incubation dans les conditions de laboratoire. Après 21 jours d'incubation, une pulvérisation de substrat traité par *Trichoderma* a été traitée aussi par des formulations à base d'huile essentielle de *C. citratus* et *T. pallenscens*.

5. Analyse de l'effet des HEs sur le taux des polyphénols et des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par **Ardestani et Yazdanparast (2007)**. Un volume de 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) a été ajouté à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation, 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75 g/l) a été ajoutée. Le mélange final a été agité puis incubé pendant 2 heures à l'obscurité à la température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) décrite par **Chua et al. (2011)** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes. 1 ml de chaque extrait et (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (2 % dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation. Nous avons effectué la même opération pour la quercitrine à différentes concentrations en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d'AlCl₃ à 2 %. Le blanc est représenté par l'éthanol additionné à l'AlCl₃, toutes les opérations sont réalisées en triplicata. Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits des plantes étudiées sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercitrine comme standard. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercitrine/g de matière sèche.

2.5.6. 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 60 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) :

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

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 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

1. Résultats

1.1. Résultats des isolements

Ce travail porte sur l'isolement, l'identification et l'effet antagoniste des *Trichoderma* isolés à partir de *T. vulgaris*. Les échantillonnages utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir de la wilaya de Mascara. La plus grande trame des genres fongiques identifiés lors des isolements effectués est groupée au sein des champignons mitosporiques, et dont la plupart des taxons appartiennent au Phylum des Ascomycota ; *Penicillium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*.

L'analyse des données affichées sur le tableau 1 montre l'isolement de cinq différentes espèces, dont *T. asperalum* est l'espèce dominante avec une fréquence d'isolement de 5,45 %. Par contre, *T. viride* est la plus faiblement isolée avec une fréquence de 4,54 %.

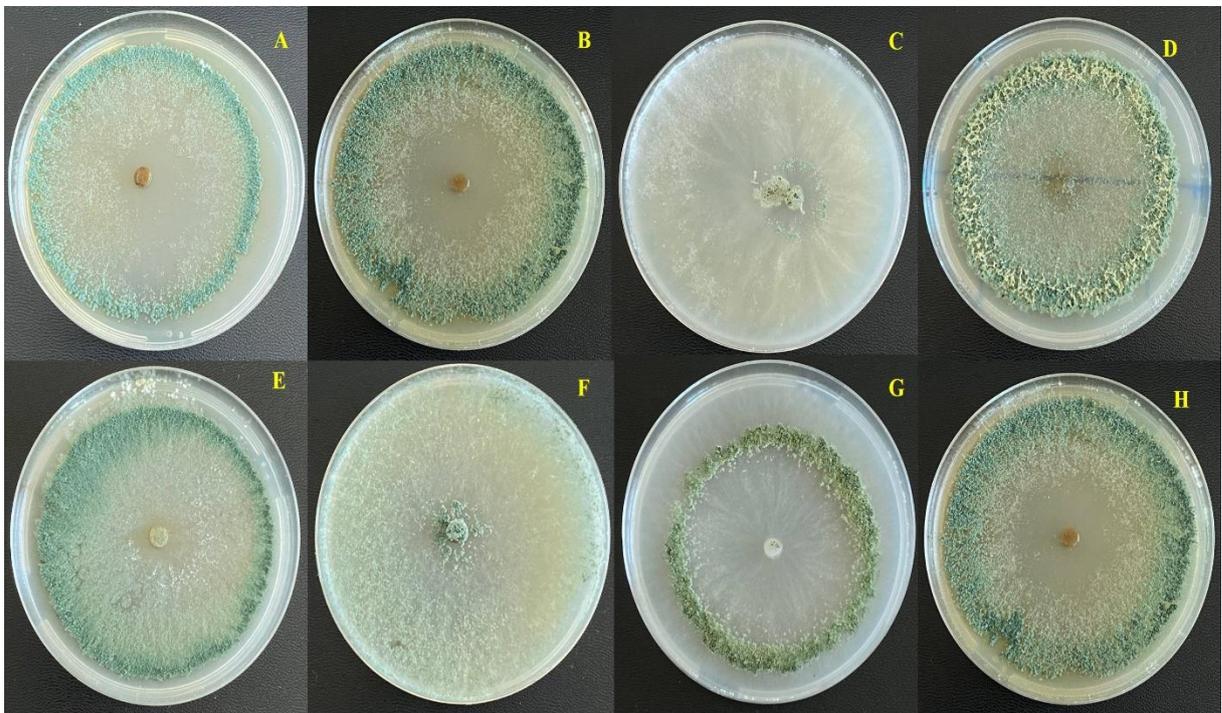


Figure 2. Matériels fongiques utilisés dans cette étude.

Tableau 2. Espèces de *Trichoderma* isolées à partir de *Thymus vulgaris*.

| Espèces | Nombre | Pourcentage |
|--------------------------|--------|-------------|
| <i>T. harzianum</i> | 5 | 22,72 |
| <i>T.asperalum</i> | 10 | 45,45 |
| <i>T. longibraciatum</i> | 4 | 18,18 |
| <i>T. atroviride</i> | 2 | 9,09 |
| <i>T. viride</i> | 1 | 4,54 |
| | 22 | 100 |

1.2. Efficacité des huiles essentielles *in vitro*

Les tests *in vitro* ont révélé que l'huile essentielle à base de thym exerce une activité antifongique très prononcée contre le Foc, dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'huile essentielle (Figure 3).

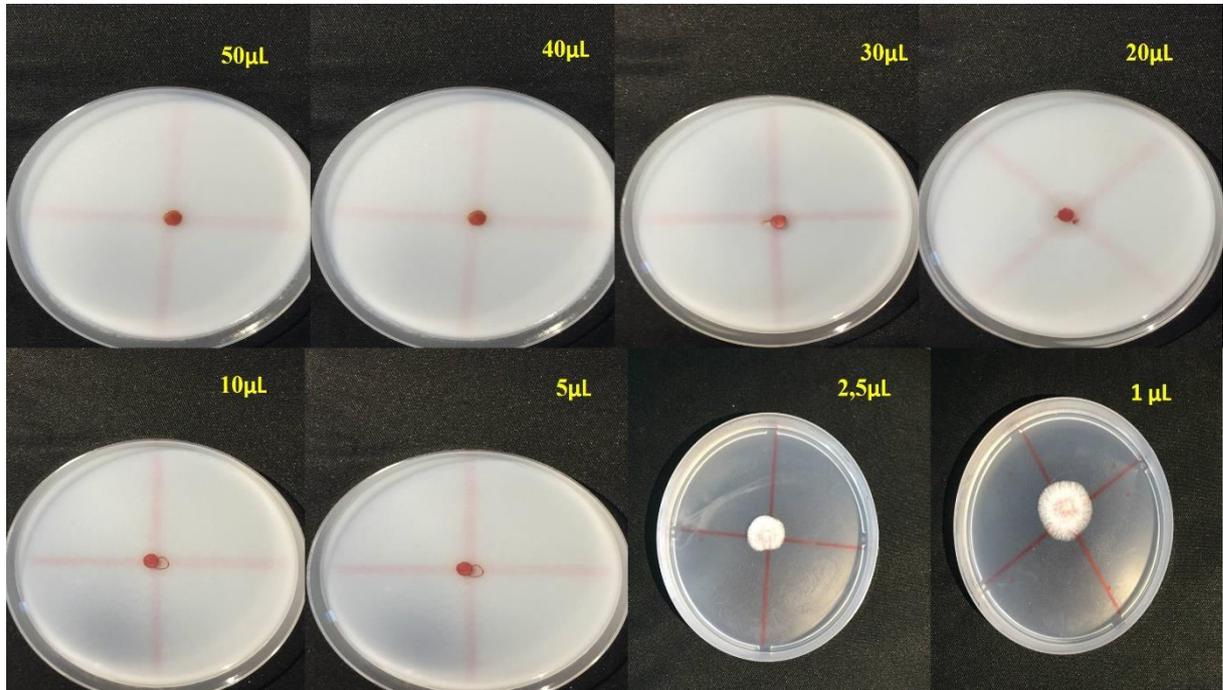


Figure 3. Efficacité de l'huile essentielle de *T. vulgaris* contre le Foc.

Tableau 2. L'effet de l'huile essentielle de *T. vulgaris* contre le Foc 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 seuil de 5 %.

| Dose $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ | ZI (%) | IS (%) | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| 50 | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a |
| 40 | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a |
| 30 | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a |
| 20 | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a |
| 10 | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a | 99,16 \pm 0,83ab |
| 5 | 100 \pm 0,00a | 100 \pm 0,00a | 99,23 \pm 0,39ab |
| 2,5 | 74,00 \pm 01,15b | 75,30 \pm 0,80b | 80,36 \pm 05,66c |
| 1 | 51,33 \pm 04,66c | 75,40 \pm 05,20c | 82,46 \pm 2,16d |
| $P < 000^*$ | $P < 000^*$ | $P < 000^*$ | $P < 000^*$ |

En effet, la concentration a montré un effet très hautement significatif ($p \leq 0.001$) sur la variation de l'inhibition de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies (tableau 01). Ce dernier effet a été expliqué par la séparation très nette des différents groupes homogènes des deux facteurs étudiés.

L'application de l'huile essentielle de *T. vulgaris* a permis de réduire significativement la croissance mycélienne du Foc, la sporulation et la germination de conidies comparativement aux témoins non traités. Les taux d'inhibition mesurés en pourcentage sont représentés dans le tableau 01.

À cet effet, l'huile essentielle de *T. vulgaris* aux concentrations 50, 40, 30, 20, 10 et 5 $\mu\text{l/ml}$ a montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies. Cependant, les concentrations de 2,5 et 1 $\mu\text{l/ml}$ ont indiqué une inhibition de 74 et 51,33 % de la croissance mycélienne.

Les mêmes concentrations ont montré une inhibition de la sporulation et de la germination des conidies avec des taux supérieurs à 75.30 %.

1.3. Effet antagonistes des *Trichoderma* contre le Foc

1.3.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture

Les tests de confrontation directe réalisés in vitro entre les espèces de *Trichoderma* sp et le Foc ont montré une action inhibitrice très importante de *Trichoderma* contre le Foc en culture mixte (figure 4).

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes 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.

Après trois jours de confrontation, l'inhibition de la vitesse devient très forte et la croissance de FOC devient pratiquement nulle. À partir du quatrième jour, on note une disparition progressive du mycélium. Cette dégradation du mycélium, qui est plus marquée au cinquième jour, avec toutes les espèces, révèle une action mycoparasitique de *Trichoderma*. L'analyse des résultats mentionnés dans la figure 4 montre l'efficacité de toutes les espèces de *Trichoderma*, dont les taux d'inhibition varient entre 68,76 % et 77,35 %. Les trois espèces *T. viride* et *T. longibrachiatum* 1 et *T. longibrachiatum* 2 sont marquées par des zones d'inhibition les plus élevées qui sont de l'ordre de 76,12 %, 76,09 % et 77,35 %, respectivement. Par contre, l'espèce *T. atroviride* a marqué la zone d'inhibition la plus faible : 68,76 %.

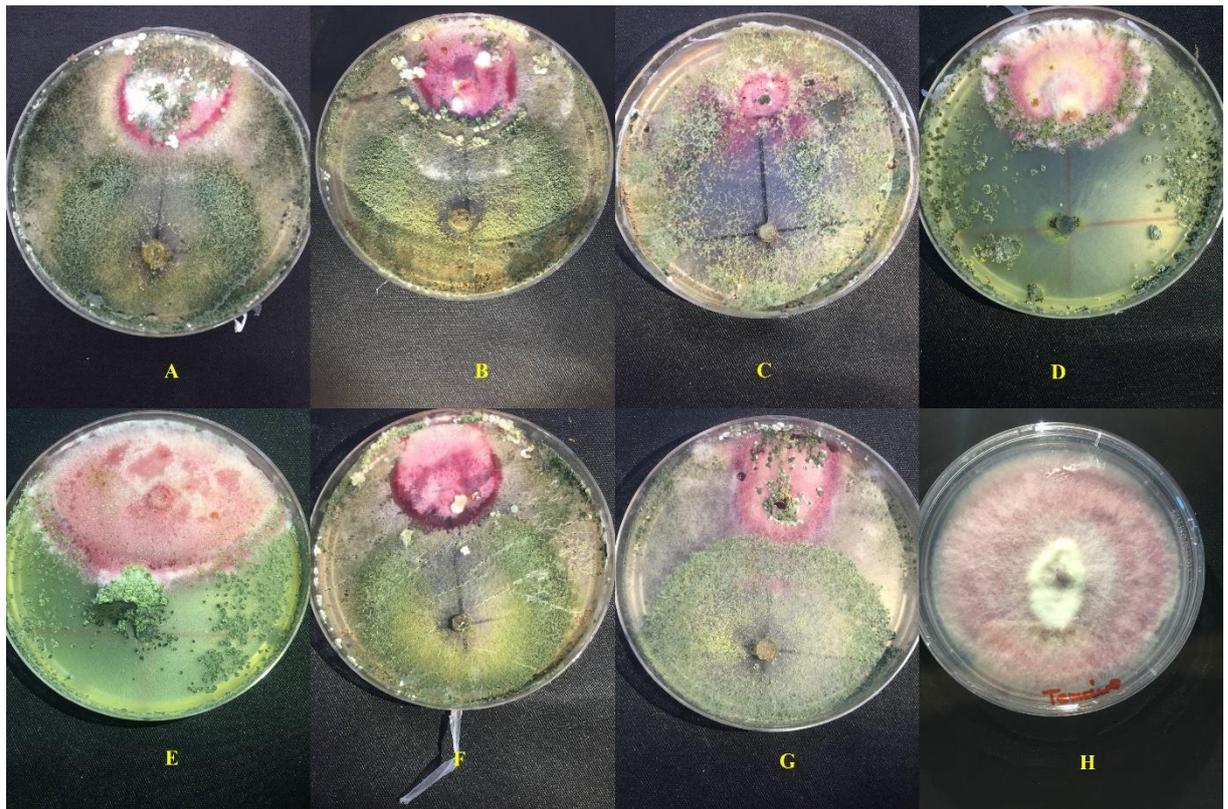


Figure 4. La confrontation directe entre le FOC (a) *T. viride*, (b) *T. viridesens* (c) *T. virens*, (d) *T. harzianum*, *T. polysporum* et avec le témoin.

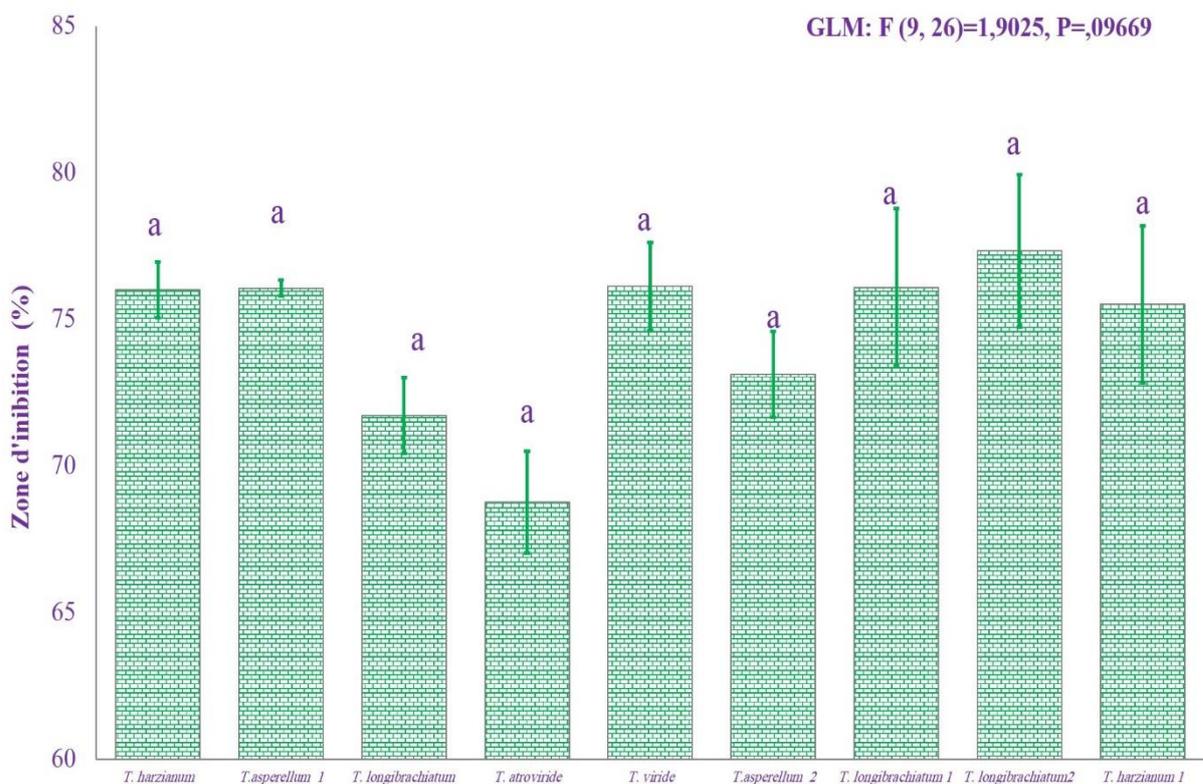


Figure 5. Présentation des résultats de test de confrontation direct des *Trichoderma* contre le Foc. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

1.3.2. Confrontation par contact indirect sur milieu de culture

La technique de confrontation indirecte nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance des *Trichoderma* exercé contre le Foc (figure 6).

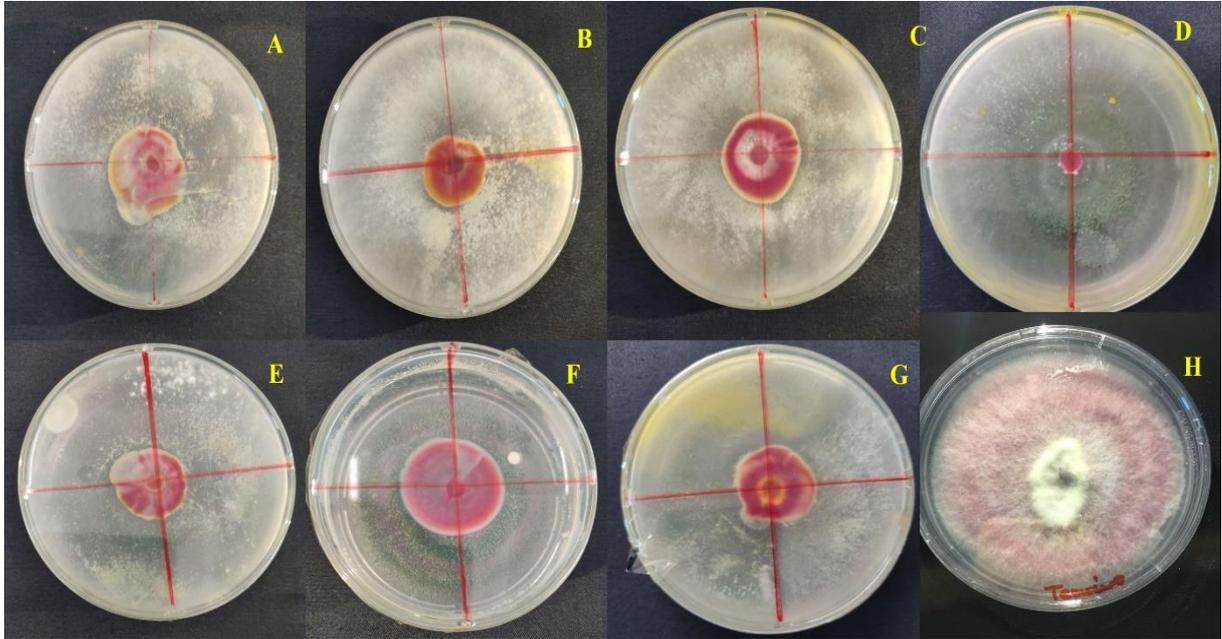


Figure 6. La confrontation indirecte entre *Trichoderma* sp et le FOC avec le témoin.

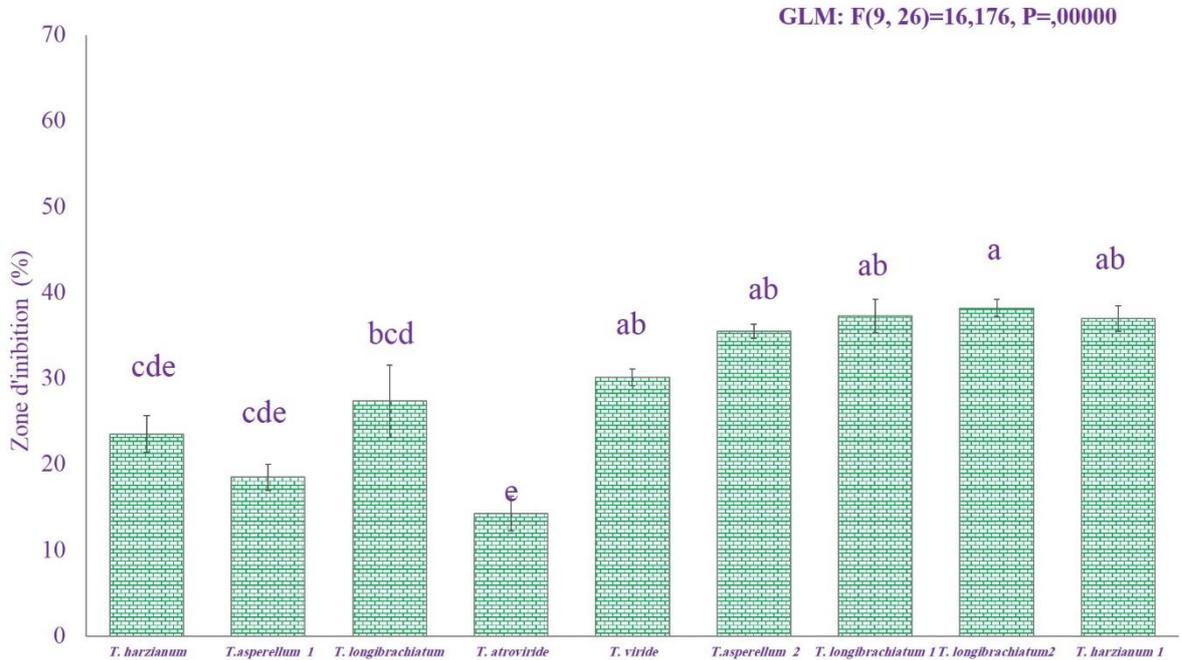


Figure 7. Présentation des résultats de test indirecte des espèces de *Trichoderma* contre le Foc. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

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 de Foc exercée par toutes les espèces de *Trichera* 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 ($p < 0.00001$) des espèces de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne. Cet effet significatif se traduit par un regroupement des espèces en fonction de leur ressemblance vis-à-vis du taux de l'inhibition de la croissance mycélienne de Foc.

L'analyse des données montre que les espèces *T. longibrachiatum* 1, *T. longibrachiatum* 2 et *T. harzianum* 1 ont montré une efficacité importante vis-à-vis du Foc, dont les zones d'inhibition enregistrées sont de l'ordre de 37,29, 38,22 et 37,01 %, respectivement. Par contre, l'espèce *T. atroviride* a montré la valeur d'inhibition la plus faible avec environ 14,27 % (figure 7).

1.4. Effet des huiles essentielles de *T. vulgaris* sur l'activité antifongique des *Trichoderma*

L'analyse des données affichées sur le tableau indique que l'huile essentielle affecte l'activité antifongique de *Trichoderma* contre le Foc (Figure 8). L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif ($p < 0.001$) de l'espèce fongique, la concentration ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs sur l'activité antifongique produite par les *Trichoderma spp.*

Dans des cas pareils, l'aspect morphotypique et le comportement antagoniste des espèces de *Trichoderma spp* a été partiellement changé. L'aspect microscopique de *Trichoderma* DK et *Trichoderma* 05 a devenu poudreux avec une coloration blanche. Bien qu'une inhibition du mycélium du Foc ait été constatée à distance, apparemment due à une sécrétion des métabolites secondaires dans le milieu de culture. La zone de contact de Foc avec les *Trichoderma* a été montrée d'un aspect jaune.

L'huile essentielle de *T. vulgaris* aux concentrations 50, 0, 30, 20 et 10 $\mu\text{l/ml}$ a inhibé totalement la croissance mycélienne de Foc et des *Trichoderma*, par conséquent empêchent l'activité antifongique des *Trichoderma*. Par contre, la dose 5, 2,5 et 1 $\mu\text{l/ml}$ expose une zone d'inhibition de Foc avec environ 94.67, 92.67 % et 87.20 % pour *T.longibrachiatum* 1, *T. longibrachiatum* 2 et *T. harzianum* 1, respectivement (tableau 3).

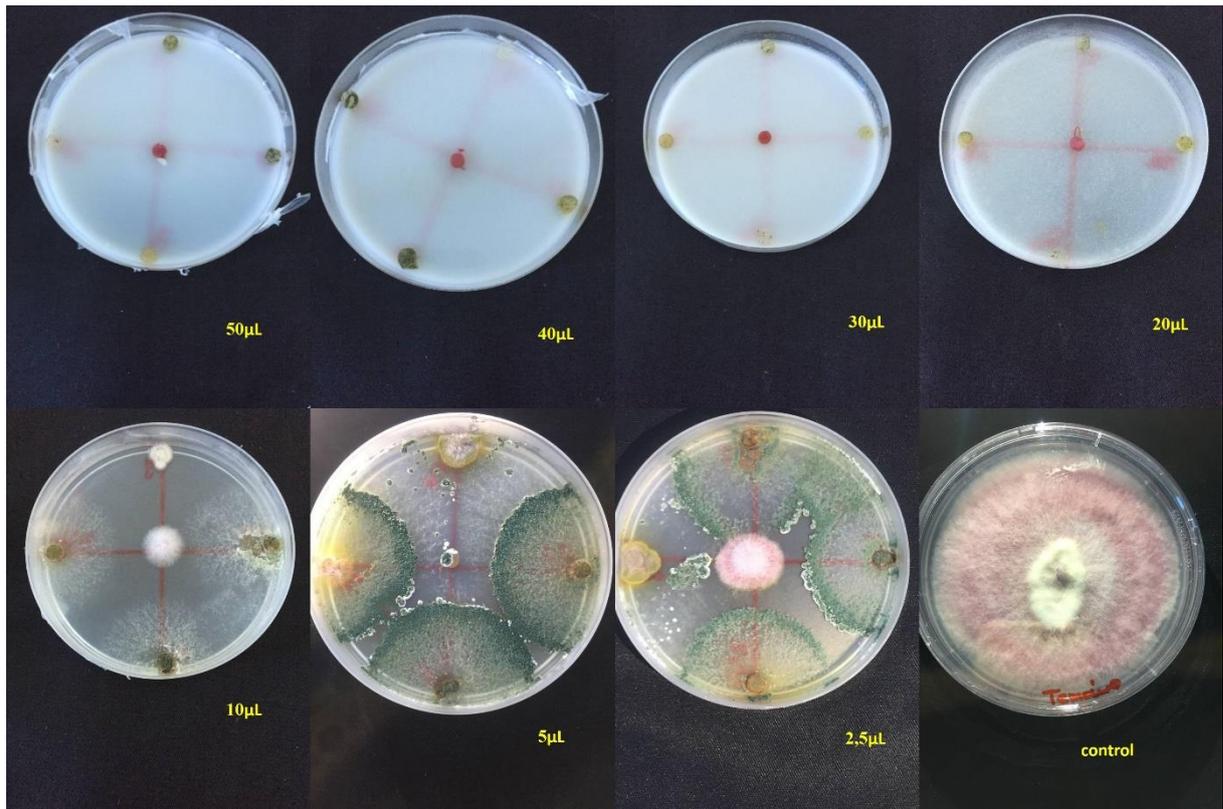


Figure 8. Effet des traitements par les huiles essentielles de *T. vulgaris* sur l'activité inhibitrice des espèces de *Trichoderma spp* contre le Foc.

Tableau 3. Effet des traitements par les huiles essentielles de *T. vulgaris* sur l'activité inhibitrice des espèces de *Trichoderma* contre le Foc.

| Espèce fongique | 1 µl/ml | 2.5 µl/ml | 5 µl/ml | 10 µl/ml | 20 µl/ml | 30 µl/ml | 40 µl/ml | 50 µl/ml |
|----------------------------|------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>T. harzianum</i> | 94.67±1.33 | 100±0.00 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. viride</i> | 94.67±1.33 | 100±0.00 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. asperalum 2</i> | 93.33±1.33 | 100±0.00 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. longibraciatum1</i> | 94.67±1.33 | 100±0.00 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. longibraciatum 2</i> | 84±1.30 | 87.33±2.3 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. harzianum 1</i> | 76±2.0 | 85.33±3.7 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. asperalum 1</i> | 78±3.20 | 88.40±2.1 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |
| <i>T. longibraciatum</i> | 80±1.16 | 86.3±1.8 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 | 100±00.0 |

1.4. Effet des huiles essentielles sur la fusariose

Le traitement du sol et des plantules de pois chiche par les huiles essentielles indiquent un effet négatif sur la maladie (figure 9). D'après l'ANOVA, la concentration a un effet très hautement significatif ($p \leq 0.001$) sur la variation de la valeur de l'AUDPC. En outre, le traitement des données par les analyses GLM a mis en évidence l'efficacité de l'huile essentielle de thymus, dont la diminution de la gravité de la maladie. Une gamme de concentration de 0,1 et 0.25 et 0,5 µl/ml a été choisie. Elle a permis d'établir des courbes dose-effet. La courbe

exprime la relation entre la dose testée et l'effet fongicide montrant une activité dose-dépendante. À cet effet, les valeurs de l'AUDPC notées chez les plantules de pois chiche traitées par les formulations de *Thymus* sont variables entre 26,25 et 285 et expliquent une diminution de la gravité de la maladie entre 65,45 et 96,81 % (figure 10).



Figure 9. Efficacité de l'huile essentielle de *T. vulgaris* contre le Foc *in vivo*.

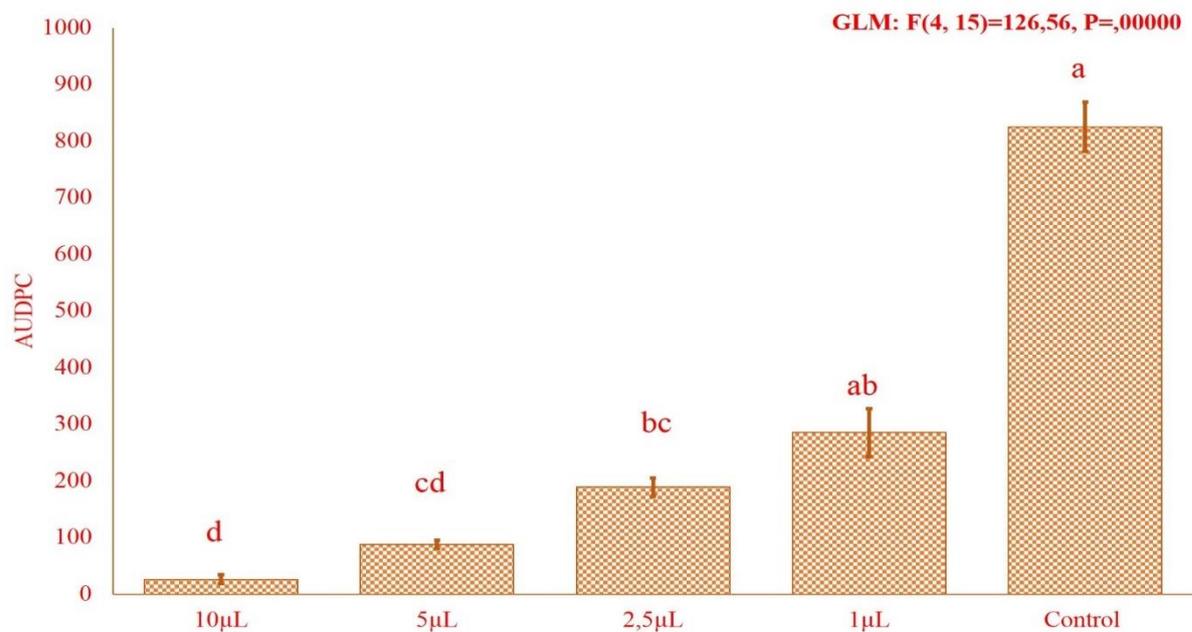


Figure 10. Résultats des traitements par les différentes concentrations de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions \pm l'erreur standard. Les lettres : a, b et...représentent le niveau de signification au seuil de 5%.

1.5. Effet des espèces de *Trichoderma* sur la fusariose

L'enrobage de la semence de la variété Flip 82 par les espèces de *Trichoderma* affirme une efficacité très remarquable contre la Foc *in vivo* (figure. 11) D'après l'ANOVA, l'espèce de *Trichoderma* a montré un effet très hautement significatif ($p \leq 0.001$) sur la variation de la valeur de l'AUDPC.



Figure 11. Efficacité des espèces de *Trichoderma* contre le Foc *in vivo*.

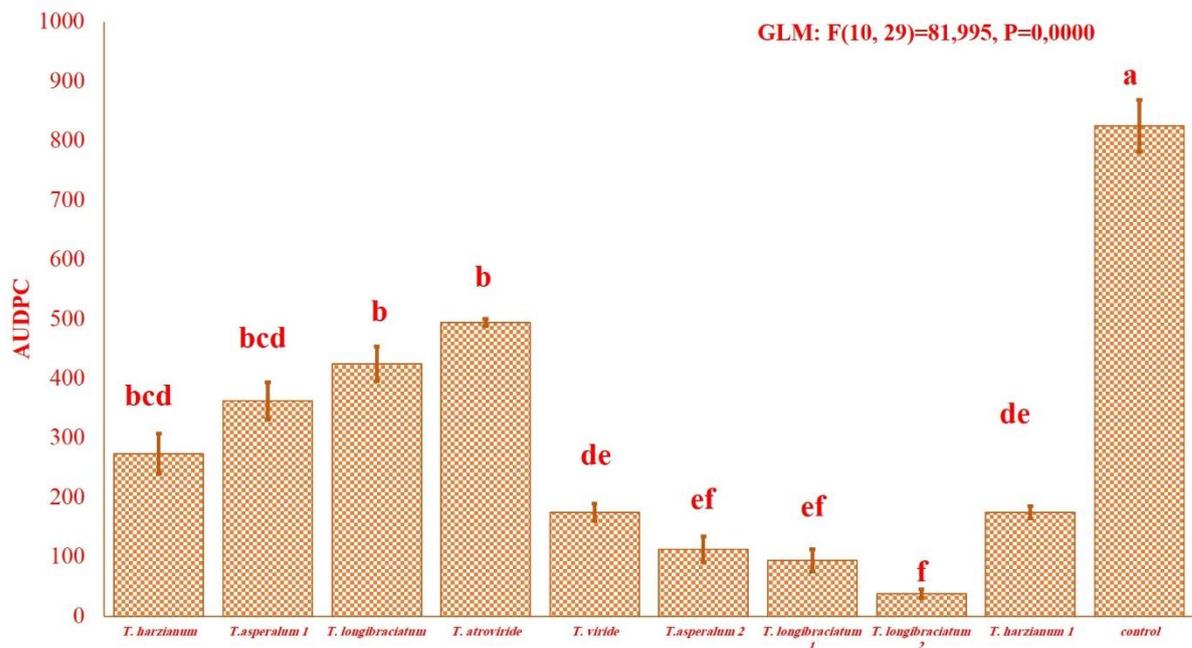


Figure 12. Efficacité des espèces de *Trichoderma* sur la fusariose vasculaire *in vivo*. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétition \pm ES. Les lettres a, b et...représentent le niveau de signification au seul de 5%.

Dans ce cadre, la lecture des données affichées sur la figure montre une diminution de la valeur de l'AUDPC entre 48,48 % et 88,63 % comparativement au témoin non traité, dont la valeur la plus élevée de l'AUDPC a été notée chez les plantules traitées avec *T. atroviride* (493,75). En revanche, la valeur la plus faible a été constatée chez les plantules traitées par *T. longibraciatum* 2 (37,5) (figure 12).

1.6. Effet des traitements associés sur la fusariose vasculaire du pois chiche

La combinaison du traitement a également indiqué une diminution très importante de la sévérité de la maladie comparée avec le traitement unique avec les antagonistes ou avec l'huile essentielle (figure 13). D'après l'ANOVA, tous les traitements testés ont un effet très hautement significatif ($P \leq 0$). La combinaison du traitement a également indiqué une diminution très importante de la sévérité de la maladie comparée avec le traitement unique avec les antagonistes ou avec les huiles essentielles. D'après l'ANOVA, tous les traitements testés ont un effet très hautement significatif ($P \leq 0.001$) sur la sévérité de la maladie.

La figure 14 montre la variation de la valeur de l'AUDPC en réponse aux différents traitements appliqués. Les résultats obtenus montrent que la valeur de l'AUDPC et le taux de réduction de la gravité de la maladie varient significativement en réponse aux variations des traitements appliqués.

L'analyse des données affichées dans la figure 14 dénonce que tous les traitements sont efficaces et les différences entre eux sont moins marquées. Cependant, les traitements SNG1 et SNG 3 semblent les plus efficaces contre le Foc, diminuent significativement la valeur de l'AUDPC d'environ 137.5 et 166.67, respectivement, comparée avec le témoin non traité. Ces valeurs traduisent une réduction très importante de la gravité de la maladie avec environ 83.66 et 88.41 %, respectivement. En parallèle, l'association SG6 semble la moins efficace, expliquant ainsi des valeurs de l'AUDPC dans l'ordre de 325, expliquent une diminution avec environ 77 41 %.

1.7. Effet des différentes combinaisons sur la teneur en polyphénols et en flavonoïdes

Le tableau 4 révèle l'existence d'une différence très hautement significative dans la variabilité des taux des polyphénols et des flavonoïdes en fonction du traitement individuel ou associé réalisé sur les plantules du pois chiche. La lecture des résultats indique une augmentation significative des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes chez les plantules ayant reçu les traitements, dont l'augmentation varie selon le traitement.

Dans ce cadre, les teneurs les plus élevées en polyphénols sont constatées chez la partie aérienne des plantules traitées avec l'huile essentielle de *T. vulgaris* à la concentration 5 μ L



Figure 13. Sévérité des symptômes de flétrissement vasculaire sur les plantules de pois chiche après les traitements.

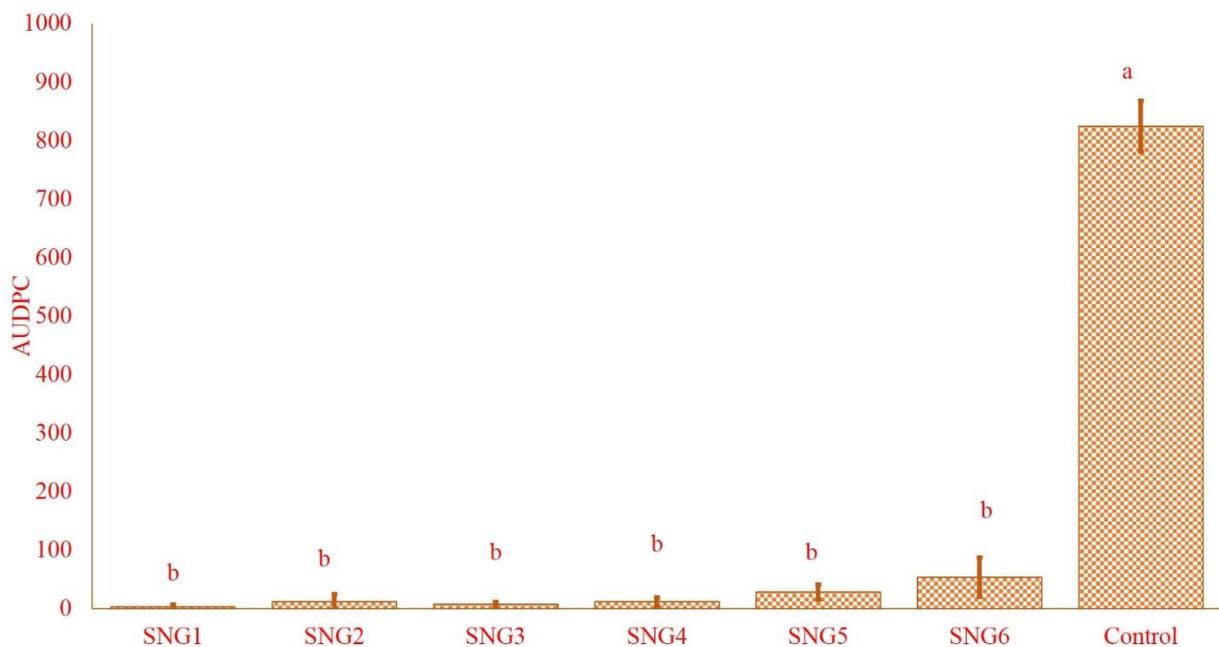


Figure 14. Résultats des traitements combinés. Les données sont les moyennes de 3 répétitions de taux des polyphénols ou des flavonoïdes \pm ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à $p < 0.05$

(62,30 mg g⁻¹), tandis que les teneurs les plus faibles en polyphénols sont constatées chez la partie aérienne des plantules traitées avec *T. longibraciatum* 2 (41.46 mg g⁻¹).

Tableau 4. Variation quantitative des teneurs en polyphénols et des flavonoïdes chez les plantules traitées avec les différentes combinaisons. Les données sont les moyennes de 4 répétitions de taux des polyphénols ou des flavonoïdes ± ES. Les lettres indiquent une différence significative entre les moyennes à p<0.05.

| | Traitement | Flavonoïdes | Taux d'augmentation(%) | Polyphénols | Taux d'augmentation(%) |
|-------------|----------------------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| T. vulgaris | 1 µL/mL | 7.57±0.33 | 61,29 | 59.45±0.10 | 61,31 |
| | 2.5 µL/mL | 9.70±0.62 | 69,79 | 58.81±0.12 | 60,89 |
| | 5 µL/mL | 10.29±0.09 | 71,53 | 61.01±0.70 | 62,30 |
| Trichoderma | <i>T. harzianum</i> | 7.80±0.20 | 62,44 | 39.84±0.11 | 42,27 |
| | <i>T. viride</i> | 5.98±0.05 | 51,00 | 39.84±0.46 | 42,27 |
| | <i>T. asperalum</i> 2 | 5.25±0.10 | 44,19 | 40.09±0.06 | 42,63 |
| | <i>T. longibraciatum</i> 1 | 7.67±0.07 | 61,80 | 39.95±0.12 | 42,43 |
| | <i>T. longibraciatum</i> 2 | 7.20±0.08 | 59,31 | 39.29±0.93 | 41,46 |
| | <i>T. harzianum</i> 1 | 8.82±0.04 | 66,78 | 40.59±0.77 | 43,34 |
| Association | SNG1 | 10.41±0.14 | 71,85 | 59.10±0.21 | 61,08 |
| | SNG2 | 10.52±0.09 | 72,15 | 59.19±0.39 | 61,14 |
| | SNG3 | 10.30±0.17 | 71,55 | 59.30±0.06 | 61,21 |
| | SNG4 | 9.60±0.08 | 69,48 | 59.92±0.16 | 61,62 |
| | SNG5 | 11.45±0.17 | 74,41 | 58.54±0.00 | 60,71 |
| | SNG6 | 12.82±0.30 | 77,15 | 59.85±0.28 | 61,57 |
| | Control | 2.39±0.25 | | 23±0.58 | |
| | P | 0.000000 | | 0.000000 | |

D'après les résultats obtenus, les valeurs des polyphénols enregistrées chez les plantules traitées affichent des pourcentages d'augmentation qui varient entre 41.46 et 62.30 % pour les traitements individuels. Cependant, elles sont de l'ordre de 61,08 et 61,59 % pour les traitements associés.

Les teneurs en flavonoïdes les plus élevées ont été constatées chez les plantules traitées avec la formulation de l'huile essentielle de *T. vulgaris* à la concentration 5 µL (10.29 mg g⁻¹). En revanche, les taux les plus faibles des teneurs en flavonoïdes sont constatés chez les plantules traitées avec les formulations de *T. asperalum* 2 (5.25 mg g⁻¹). À l'issue des résultats obtenus, on déduit que les différentes combinaisons ont marqué une augmentation significative des taux des flavonoïdes qui varie entre de 69,48 jusqu'à 77,15 %. Cependant, elles sont de l'ordre de 61,08 et 61,59 % pour les traitements associés.

2. Discussion

L'utilisation massive 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 particulier pour développer d'autres techniques de lutte alternatives. Les bioproduits d'origine végétale et fongique contiennent des molécules biologiquement actives et qui sont bénéfiques pour l'humanité. Ces produits ont été avérés d'une grande activité antimicrobienne et jouent un rôle important dans la lutte contre les phytopathogènes (**Nunes et al., 2024, Prakash et al., 2024**).

Dans le présent travail, l'huile essentielle de *T. vulgaris* aux concentrations 50, 40, 30, 20, 10 et 5 $\mu\text{l/ml}$ a montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies. Cependant, les concentrations de 2, concentrations de 2,5 et 1 $\mu\text{l/ml}$ ont indiqué une inhibition de 51,33 et 74 74 % de la croissance mycélienne, de mycélienne, de la sporulation et de et de la germination des spores. Toutefois, une réduction significative de la sévérité de la maladie avec des fréquences variables entre 10 et 15 %. Les résultats des tests des tests de pouvoir fongicide sont très encourageants du fait qu'ils constituent une initiative sur l'intérêt agronomique des plantes médicinales en général et le *T. vulgaris* en spécifique.

L'activité antifongique des huiles essentielles peut s'expliquer par leurs principaux composés (**Herman et al., 2016 ; Carovic-Stanko et al., 2010**) et les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques). Des composés chimiques qui ont une grande efficacité et à plus large spectre sont présents dans les huiles essentielles, en particulier les phénols (1,8 cinéolecinéole, carvacrol, octanol...) les alcools (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones (Camphor, etc.) (**Sokovic et Griensven, 2006 ; Dorman et Deans, 2000, Zanotto et al., 2023**). L'activité antifongique des huiles essentielles et de et de ces dérivés et en particulier le thymol, le carvacrol et, peut se faire selon différents mécanismes (**Zanotto et al., 2023**). Ces effets peuvent être manifestés par une attaque sur la composition phospholipidique des membranes cellulaires fongiques, la perturbation des systèmes enzymatiques, l'inactivation et la destruction du matériel génétique fongique. L'. 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//ou le transport actif (**Badawy et Abdelgaleil, 2014, Qi et al.**).

En effet, les huiles essentielles sont des composés hydrophobes, s'hydrophobes, s'infiltrant dans les bicouches phospholipidiques des membranes cellulaires et des

mitochondries, provoquant une déformation de leur structure et les rendant plus sensibles à la perforation (Sikkema *et al.*, 1995, Badawy et Ab-delgaleil, 2014).

Les huiles essentielles ont montré une activité antifongique contre une variété de phytopathogènes (Moutassem *et al.*, 2019 ; Nie *et al.*, 2024, Nunes *et al.*, 2024, Prakash *et al.*, 2024). Le pouvoir biocide et les différences observées dans l'efficacité des huiles essentielles sont expliqués d'une part par la composition et la richesse des huiles testées en composés antifongiques et par la variabilité en fonction des espèces végétales d'autre part (Moutassem *et al.*, 2019 ; Nie *et al.*, 2024, Nunes *et al.*, 2024, Prakash *et al.*, 2024).

D'après les résultats de l'analyse par GS-MS, il paraît que les phénolsphénols, les monoterpénoides, les monoterpènes et les sesquiterpène sont les constituants majeurs de l'huile essentielle de *T. vulgaris* représentant un intérêt antifongique potentiel contre une variété de phytopathogènes (Qi *et al.*, 2023, Posgay *et al.*, 2022). En effet, le thymol, linalool, γ -terpinène, p-cymène étaient également fortement efficaces contre une multitude de pathogènes, y compris *F. oxysporum*, avec même des concentrations faibles (Qi *et al.*, 2023, Posgay *et al.*, 2022, Wan *et al.*, 2019b, Pilozo *et al.*, 2024). Ces composants acides ont montré une activité inhibitrice élevée de la croissance mycélienne d'*Alternaria solani* Sorauer, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum* (Lu *et al.*, 2008).

Dans notre étude, le traitement des plantules du pois chiche par l'huile essentielle de *T. vulgaris* a suivi la même tendance que le traitement *in vitro* et les résultats obtenus montrent la diminution de la gravité de la maladie avec des fréquences supérieures à 20 %. L'efficacité de cette huile est dose dépendante, elle augmente avec l'augmentation de la dose. 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* dans notre étude.

Dans les conditions *in vitro*, les résultats relatifs à l'effet antagoniste de nouvelles espèces du *Trichoderma sp* présentent une éventuelle efficacité à l'égard du Foc *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats repèrent l'efficacité soit en tests directs et indirects. Dans ce cadre, la zone d'inhibition obtenue varie entre 73.98 et 83.05 % pour les tests directs et 27.86 et 54.79 % dans les tests indirects. Nos résultats suggèrent aussi l'efficacité des *Trichoderma* contre le Foc *in vivo*. Ces résultats indiquent la grande compétitivité des espèces de *Trichoderma* envers le Foc.

Regardant les résultats de la confrontation indirecte des espèces de *Trichoderma* envers le Foc, nous ordonnons également à anticiper que le *Trichoderma* inhibe la croissance mycélienne du Foc par la fabrication de substances volatiles. Nos résultats démontrent des zones d'inhibition variable entre 120 et 20 %. En effet, l'antibiose est un mécanisme d'antagonisme induit par des métabolites secondaires spécifiques ou non spécifiques d'origine

fongique, par des substances volatiles et d'autres composés toxiques (Dennis et Websters, 1971., Toghueo *et al.*, 2016, Mukherjee *et al.*, 2022 ; sad 2022).

Le succès de *Trichoderma* en tant qu'agent de lutte biologique contre diverses phytopathogènes est associé à la production d'un nombre excessif de composés et de métabolites bioactifs, y compris les métabolites secondaires (Zeilinger *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2018).

Ces dernières années, *Trichoderma spp* est de plus en plus utilisée dans le contrôle des maladies transmises par le sol, en particulier des fusarioses vasculaires latérales des plantes, en raison de ses activités actives de biocontrôle par plusieurs mécanismes (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016 ; Gava *et coll.*, 2016 ; Jogaiah *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2022 ; Sa- daña- Mendoza *et al.*, 2023 ; Adnani *et al.*, 2024).

Les observations microscopiques au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes montrent une altération du mycélium du Foc, une croissance rapide des *Trichoderma*, une excellente lyse, une transformation dans les cordons des filaments mycéliens et l'enroulement du mycélium de *Trichoderma* sur celui du pathogène.

La croissance rapide est la caractéristique commune des *Trichoderma spp.*, ce qui signifie que ces espèces pourraient directement s'emparer de l'espace de croissance commun avec les pathogènes (Rahman *et al.*, 2015 ; Wang *et coll.*, 2021 ; Saldaña- Mendoza *et al.*, 2023). En effet, les *Trichoderma* peuvent également identifier le mycélium pathogène grâce à des lectines exogènes spécifiques à la surface cellulaire des champignons hôtes, pénètrent et parasitent le mycélium de l'hôte en sécrétant un grand nombre d'enzymes dégradant la paroi cellulaire pour obtenir des nutriments et des réponses propres à son propre croissance et de reproduction (Rajani *et al.*, 2021 ; Singh *et al.*, 2022). Dans la double culture test, nous avons constaté que le taux de croissance de toutes les souches de *Trichoderma* testées était plus rapide que celui du Foc. Fait intéressant, nous avons également constaté que certaines souches de *Trichoderma* peuvent continuer à se développer sur la colonie FOC, telles que *T. asperellum*, alors que certaines souches de *Trichoderma* étaient dans un « état d'impasse » avec le FOC.

Un nombre important d'études récentes a porté sur l'effet de *T. viride* et *T. harzianum* sur une variété des parasites des plantes (Saravanakumar *et al.*, 2016 ; Toghueo *et al.*, 2016). Ces deux espèces impliquent des mécanismes variés pour inhiber les phytopathogènes, dont les principaux sont le mycoparasitisme et l'antibiose (Chet, 1990). Les résultats obtenus par Wang *et al.* (2023) sont en accord avec nos résultats ces derniers ont montré l'efficacité des *Trichoderma asperellum* contre *Fusarium oxysporum F. sp. cucumerinum* en culture mixte et à distance, dont les zones d'inhibition sont variables entre 40 et 70 %. Nos résultats corroborent ceux obtenus par Younesi *et al.*, 2021 qui montrent que huit isolats, à savoir *Trichoderma*

harzianum, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pleurotum*, *T. crassum*, *T. guizhouense* et *Trichoderma sp.*, ont supprimé la croissance des colonies de Foc avec des fréquences variables entre 61,1 à 65,5 % en test direct. Ces espèces ont été testées in vitro pour la production de substances volatiles. Les huit isolats sélectionnés ont produit des métabolites volatils qui ont empêché la croissance radiale du Foc avec des zones d'inhibition de 17,5 % à 31,0 %.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Chihat et al., 2021**, en confrontation directe, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc., *Botrytis cinerea* (Pers.), *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout et *Rhizoctonia solani* (J.G. Kühna) a été a été trouvé entre 37,22 % et 80,95 %, tandis qu'en confrontation indirecte, il se situait entre 100 100 % et 88,89 %. 88,89 %. Les résultats obtenus par **Mishra et al. 2022** indiquent une excellente zone d'inhibition du Foc par *Trichoderma asperellum* avec environ (76.58 et 73.29 %), respectivement.

Dans notre étude, nous avons démontré à travers l'observation microscopique de la zone d'interaction entre des hyphes que les hyphes de *T. viride* et *T. harzianum* s'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 de *T. harzianum* et *T. viride* Ceci est conforme aux résultats antérieurs rapportés par plusieurs chercheurs (**Toghueo et al., 2016 ; El-Debaiky, 2017**).

De plus, une grande variété de métabolites secondaires (dont substances volatiles et non volatiles) est produite par les différentes espèces de *Trichoderma*, et leur capacité antagoniste est directement liée à la sécrétion de certaines substances (**Hyde et al., 2019 ; Nuankeaw et al., 2020 ; Nandini et coll., 2021**).

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

Des résultats antérieurs énoncent que l'antibiose est l'un des mécanismes importants impliqués dans la lutte biologique contre Foc (**Dennis et Webster, 1971 ; Dubey et al., 2007**,

Moutassem et al., 2020). Les métabolites secondaires produits par *T. asperellum* FJ035 ont montré la meilleure capacité antagoniste parmi les souches testées, en particulier les substances non volatiles ont inhibé le FOC de 59,67 %, ce qui indiquait que *T. asperellum* FJ035 était plus « agressif envers » Foc.

Nos résultats indiquent également un effet fongicide des huiles essentielles de *T. vulgaris* contre le Foc in vitro et même en traitement individuel in vivo. Les résultats obtenus indiquent une diminution significative de la gravité de la maladie avec environ 10 % en appliquant la concentration 0,5. Autrement, la diminution de la gravité de la maladie est d'environ 10 % et 15 % après l'utilisation des *T. harzianum* et *T. viride* en traitements individuels. En comparaison avec les traitements combinés, en constatant une augmentation d'environ 10 et 15 %.

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 inoculées 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 plantes aromatiques, 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 recherches effectuées par **Larkin, (2016)** indiquent l'augmentation de la population de *T. virens* et *T. harzianum* dans le sol prétraité 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 %.

Les données de l'expérience en pot ont exposé que tous les agents biologiques testés pourraient réduire significativement la sévérité de la maladie avec des degrés variables. Toutefois, une augmentation significative ($P < 0,05$) du niveau de protection a été constatée lorsque l'huile essentielle de *T. vulgaris* est utilisée en traitement associé avec les *Trichoderma*. Cette activité prononcée des combinaisons procédées peut être due à l'effet synergique des substances bioactives des huiles essentielles avec ceux des *Trichoderma*.

Les données in vitro peuvent être expliquées par ces effets synergiques en appliquant les huiles essentielles sur le *Trichoderma* en constatant une diminution de la croissance mycélienne et une augmentation de la sporulation chez les espèces de *Trichoderma* exposées à la même concentration de l'huile essentielle de *T. pallescens*. À cet égard, on déduit que les *Trichoderma spp* résistaient aux faibles concentrations de l'huile essentielle de thym en comparaison avec le Foc. Ces constatations expliquent d'une part l'effet fongicide des huiles essentielles contre le

Foc et l'effet synergique des huiles essentielles en association avec les *Trichoderma spp* d'autre part.

Ces constatations peuvent être expliquées par l'effet synergique des composés des huiles essentielles en association avec les composés d'origine fongique. Ces substances peuvent agir différemment sur les voies de signalisation et 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 dû à des effets synergiques.

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 des agents biologiques contre une multitude d'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.

Les travaux d'**Osorio et al. (2021)** montrent que les applications d'huiles essentielles avec des faibles doses (30 mg/mL) n'ont pas affecté le champignon bénéfique *T. asperellum*. Nos analyses d'amarrage moléculaire ont renforcé la sélectivité des huiles essentielles vis-à-vis les agents de lutte biologique, et en particulier les *Trichoderma spp*, ce qui est en accord avec nos résultats.

En effet, des études récentes menées par **El-Sharkawy et al. (2018)** indiquent l'efficacité d'une diminution de la sévérité de la maladie d'environ 57,15 % après le traitement des plantules par *T. harzianum*, la même fréquence après le traitement par un mélange de champignons mycorhiziens et plus de 85,71 % avec un traitement combiné de *T. harzianum* et du mélange champignons mycorhiziens.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de certaines études précédentes, qui rapportent l'effet positif de *Trichoderma* sur la production de l'huile essentielle de *Mentha × piperita L*, expliquent le synergisme positif entre les huiles essentielles et les *Trichoderma* (Guo et al., 2020). Ce constat consolide nos résultats sur le synergisme positif entre les huiles essentielles et les *Trichoderma*.

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 %), l'aloë vera (2 %) ou le chitosane (1 %) en traitement combiné et individuel 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 peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, B-1,3-glucanase, chitinase, catalase et superoxide dismutase et des 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 du chitosane comparé avec les contrôles non traités et les traitements individuels, respectivement.

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 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 rolfisii* 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 obtenues sont d'environ 16,4 % pour le traitement par huile de thym et de 12,2 % pour le traitement par *T. harzianum* et de 11,4 % pour le traitement huile de thym+*T. harzianum* en association.

Dans les conditions de laboratoire, la combinaison Trichoderma+huile essentielle augmente significativement l'activité antagoniste (**Abdel-Kader et al., 2011**) contre *Sclerotinia sclerotiorum*. La croissance mycélienne de ce pathogène en traitement combiné *T. harzianum* + huile essentielle de thym est de 34,79, 56,53 et 78,27 % à la concentration de 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 individuel. Par ailleurs, ces valeurs se 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 extraits de *Azardica indica* et *T. harzianum* en traitement combiné contre le Foc ont montré une efficacité supérieure à celle des traitements individuels ou sans équivoque à celle des traitements par les pesticides (**Hossain et al., 2013**). L'incidence enregistrée est de 16,6 % après un traitement par *T. harzianum*, 15,47 % par le traitement *Azardica indica* et 13,09 % après un traitement combiné *T. harzianum*+extraits d'*Azardica indica* comparé avec le contrôle sans traitement de 22,61 %.

Une augmentation de l'efficacité des traitements combinés à base de bactérie et d'extraits botaniques comparés par le traitement unique contre *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* a été constatée (Akila *et al.*, 2011). Les résultats obtenus indiquent des taux de diminution d'environ 9 % par le traitement extrait botanique, 37-45 % avec le traitement avec les agents biologiques et plus de 63 % de réduction avec le traitement combiné.

Dans le même ordre d'idées, Muthukumar *et al.* (2010) ont rapporté l'augmentation du niveau de protection de *Capsicum annum* contre *Pythium aphanidermatum* en traitements associés des agents de lutte biologique et des extraits de plantes comparé avec le traitement individuel. Le traitement des semences par les extraits d'*Allium cepa* L. et *Allium sativum* L., *T. viride* et les extraits+*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* combiné avec le *Trichoderma* a entraîné une augmentation du niveau de protection d'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 *Moringa oleifera* et à 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 intégré 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, de 41,4 % après un traitement combiné *T. harzianum*+huile essentielle de thym.

Les travaux de Zamani-Zadeh *et al.* (2014) témoignant de 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) ont entraîné une amélioration remarquable du niveau de protection contre les infections de *Botrytis cinerea*, en comparaison avec l'application de *Lactobacillus plantarum* ou d'huile essentielle en traitement individuel.

Des résultats contradictoires ont été obtenus par Abo-Elyousr *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 %.

Dans notre étude, les différences qui se sont dégagées dans les mesures des protéines, des lipides et des glucides ont permis de démontrer que ces traitements pouvaient améliorer le

métabolisme de la plante et, par conséquent, la croissance du pois chiche. Des augmentations de la hauteur ainsi que du poids sec des parties aériennes des plantes ont été observées. Ce constat peut être probablement attribué à l'effet stimulateur des *Trichoderma* et des huiles essentielles sur les hormones de croissance des plantules traitées proportionnellement aux plantules non traitées. Divers régulateurs de la croissance ont été produits par *Trichoderma spp* comme l'hormone végétale acide indole-3-acétique, harzianolide, harzianopyridone ou acide harzianique. Autrement, le composé volatil 2,3-butanediol a été détecté par analyse GC-MS dans le filtrat de culture de *Trichoderma spp*. Ce métabolite secondaire a un effet stimulant sur la croissance des plantes.

Nos résultats indiquent une diminution significative de la gravité de la maladie avec des fréquences variables entre 55.59 et 85.93 % en comparaison avec les traitements individuels. Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet synergique des composés des huiles essentielles en association avec les composés d'origine fongique. Ces substances peuvent agir différemment sur les voies de signalisation et les inductions des mécanismes de résistance des plantules de pois chiche envers 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 dû à des effets synergiques.

En effet, l'accumulation des polyphénols et des flavonoïdes a été démontrée chez plusieurs espèces végétales et dans plusieurs situations de stress biotique et abiotique. Toutefois, l'accumulation de ces composés joue un rôle déterminant dans la mise en place des mécanismes de défense contre les phytopathogènes (Clériveret *et al.*, 1996). En effet, l'accumulation des phénols permet la protection de la membrane cellulaire et implique principalement la lignification des parois cellulaires en empêchant la pénétration et la progression des pathogènes, ce qui explique en partie la diminution de la sévérité de la maladie après le traitement par différentes huiles essentielles observées dans nos expériences (Wang *et al.*, 2008, Jin *et al.*, 2011, Ben-Jabeur *et al.*, 2015).

Ces résultats sont probablement expliqués par l'augmentation de l'activité des précurseurs de synthèse des polyphénols chez les plantules reçues un traitement combiné comparativement aux traitements individuels. Nos résultats sont analogues à ceux obtenus par Singh *et al.* (2014). Ces chercheurs ont démontré l'augmentation des taux de polyphénols chez les plantules de pois chiche traitées avec les associations *Pseudomonas/T. harzainum* envers *Sclerotium rolfsii* en comparaison avec les traitements individuels. À cet effet, les valeurs de l'acide shikimique variait de 848.7 à 6288 µg/g, acide gallique 66.9 à 210 µg/g, acide t-chlorogénique 24.2 à 168.3 µg/g, acide tannique 58.1 à 129.1 µg/g, acide syringique de 17.27 à

576.7 µg/g pour les traitements individuels. Cependant, les traitements associés se sont avérés plus efficaces et surmontent plus le taux des polyphénols, où l'acide shikimique s'était accumulé 7,41 fois, l'acide T-chlorogénique 3 fois, l'acide férulique 17,6 fois, myricétine 2,5 fois, quercétine 1,3 fois et l'acide syringique 11.3.

De même, **Jain et al. (2015)** suggèrent que les taux des précurseurs des phénols représentés par l'acide shikimique, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide syringique, l'acide p-coumarique, l'acide cinnamique, l'acide salicylique, la myricitine et la 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 trait. Par contre, une diminution dans les taux de ces derniers chez les témoins inoculés comparativement aux témoins négatifs.

À titre d'exemple, les taux de l'acide shikimique sont nettement augmentés trois fois et 4 fois plus chez les plantules de petits pois qui subissent des traitements avec 2 (14972 µg/g) et trois (15093.3 µg/g) agents de lutte biologique, en comparaison avec les témoins non traités (2939.9) et les traitements individuels *B. subtilis* (6654.3 µg/g), *P. aeruginosa* (8386.8 µg/g) et *T. harzia*. 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 résultats obtenus sont en accordance avec ceux obtenus par **Moutassem et al. (2019)** qui rapportent l'efficacité des huiles essentielles de six plantes médicinales sur le foc avec des taux variables selon l'huile essentielle et la concentration utilisée. Les résultats obtenus par ces chercheurs sont attribués à l'induction des mécanismes de résistance des plantules de pois chiche contre le Foc, notamment l'augmentation des taux des polyphénols et des flavonoïdes chez les plantules traitées. Nos résultats corroborent ceux obtenus par ces chercheurs où nous avons constaté l'augmentation des taux des polyphénols et des flavonoïdes avec des taux supérieurs à 15 et 20 %, respectivement.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de l'huile essentielle de *T. vulgaris* et de neuf espèces de *Trichoderma* contre le Foc in vitro et in vivo en traitement individuel et associé.

Ce travail expose l'isolement de cinq différentes espèces à partir de *Thymus vulgaris*, dont *T. asperatum* est l'espèce dominante avec une fréquence d'isolement de 5.45 %. Par contre, *T. viride* est la plus faiblement isolée avec une fréquence de 4,54 %.

Les tests in vitro ont révélé que l'huile essentielle à base de thym exerce une activité antifongique très prononcée contre le Foc, dont l'intensité varie en fonction de la concentration de l'huile essentielle. À cet effet, les concentrations 50, 40, 30, 20, 10 et 5 µL/ml ont montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies. Cependant, les concentrations de 2,5 et 1 µl/ml ont indiqué une inhibition de 74 et 51,33 % de la croissance mycélienne.

Les tests de confrontation directe et indirecte in vitro entre les espèces de *Trichoderma sp* et le Foc ont montré une action inhibitrice très importante de *Trichoderma* contre le Foc.

Pour les tests directs, les trois espèces *T. viride* et *T. longibrachiatum* 1 et *T. longibrachiatum* 2 ont marqué les zones d'inhibition les plus élevées qui sont de l'ordre de 76,12 %, 76,09 % et 77,35 %, respectivement. Pour le test indirect, *T. longibrachiatum* 1, *T. longibrachiatum* 2 et *T. harzianum* 1 ont montré une efficacité importante vis-à-vis le Foc, dont les zones d'inhibition enregistrées sont de l'ordre de 37,29, 38,22 et 37,01 %, respectivement.

L'analyse de synergisme in vitro montre que l'huile essentielle de *T. vulgaris* aux concentrations 50, 0, 30, 20 et 10 µl/ml a inhibé totalement la croissance mycélienne de Foc et des *Trichoderma*, par conséquent empêchant l'activité antifongique des *Trichoderma*. Par contre, les doses 5, 2,5 et 1 µl/ml exposent une zone d'inhibition de Foc avec environ 94.67, 92.67 % et 87.20 % pour *T. longibrachiatum* 1, *T. longibrachiatum* 2 et *T. harzianum* 1, respectivement. Par ailleurs, l'analyse de l'effet de l'association huile essentielle et *Trichoderma spp* expose des modifications parfois profondes sur l'aspect morphotypique et le comportement antagoniste des souches fongiques.

Les tests in vivo, le traitement des plantules de pois chiche confirme les résultats obtenus in vitro, voire diminue la gravité de la maladie représentée par les valeurs de l'AUDPC et qui sont variables entre 20.5 et 37.7, expriment des diminutions variables entre 36,01 % jusqu'à 65,25 %.

Par ailleurs, ces valeurs sont de l'ordre de 65.45 et 96,81 % chez les plantules contrôlées par les huiles essentielles de *T. vulgaris*, dont l'efficacité est dose dépendante. Les différentes espèces de *Trichoderma sp* exercent pareillement une réduction de la gravité de la maladie avec des taux variables entre 48,48 % et 88,63 %.

L'association des traitements a mis en évidence un synergisme positif avec les faibles doses de l'huile essentielle de *T. vulgaris*, qui se traduit par une diminution très significative de la sévérité de la maladie, dont l'intensité est supérieure en comparaison avec les traitements individuels. Ces traitements sont marqués par des diminutions variables entre 83.66 et 88.41 %.

La lecture des résultats indique une augmentation significative des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes chez les plantules ayant reçu les traitements, dont l'augmentation varie selon le traitement.

Dans cette étude, des développements de stratégies de lutte innovantes ont été mis en œuvre pour améliorer l'efficacité des traitements biologiques contre la fusariose vasculaire de pois chiche. En effet, l'application ordonnée utilisant les deux agents offre une excellente alternative pour augmenter le rendement et la croissance des cultures tout en gérant le stress biologique. Ce modeste travail montre que les molécules bioactives présentes dans les huiles essentielles interagissent d'une manière synergique avec celle des *Trichoderma* pour améliorer l'activité antifongique contre le Foc.

Ces avancées méritent d'être mieux exploitées et consolidées par d'autres travaux de recherche portant les mêmes objectifs. Les perspectives de cette étude s'inscrivent d'une part dans des études très approfondies portées sur les analyses moléculaires des souches et les biomolécules responsables de l'effet synergétique, et dans la recherche de d'autres techniques de lutte innovantes basées sur le synergisme approuvé.

REFEFRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Kader, M. M., El-Shafie, M. M., El-Gendy, A. E., & Farag, R. S. (2011). Phytochemical analysis and pharmacological screening of *Moringa oleifera* leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 139-146.
- Abdel-Kader, M. M., El-Shafie, M. M., El-Gendy, A. E., & Farag, R. S. (2013). Evaluation of the antioxidant and antibacterial activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(2), 142-149.
- Abo-Elyousr, K. A., El-Shafie, M. M., El-Gendy, A. E., & Farag, R. S. (2014). Antidiabetic activity of *Moringa oleifera* leaves extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1-7.
- Adandonon, J. F., Ahouansou, A., Akpo, S., Adjanohoun, E., & Gbaguidi, F. (2006). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the treatment of diabetes in Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 419-433.
- Adnani, M., Dall'Olio, S., & Bouriche, H. (2024). Micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. and its application in the field. *Plants*, 13(4), 507.
- Akdeniz, R. O., & Kesimci, R. (2024). A comprehensive review of the nutritional and medicinal properties of *Moringa oleifera*: A potential nutraceutical. *Journal of Food Science and Technology*, 61(1), 1-17.
- Akila, R., Selvaraj, Y., & Balakrishnan, S. (2011). Anti-diabetic activity of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(5), 1183-1189.
- Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007). Evaluation of the hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 21(10), 925-928.
- Badawy, M. E., & Abdelgaleil, S. A. (2014). *Moringa oleifera*: A review on its potential use in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1-13.
- Barnett, H. L. (1960). The use of *Moringa oleifera* in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 174(1), 7-10.
- Belabid, A., Benhalima, K., & Bouziane, N. (2010). Impact of *Moringa oleifera* on the biochemical parameters of diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 150-154.
- Benhamou, C., & Chet, I. (1996). The influence of *Moringa oleifera* on the growth and yield of *Hordeum vulgare* L. *Journal of Plant Nutrition*, 19(9), 1645-1655.
- Bill, M., Boucher, B., & Brown, S. (2014). *Moringa oleifera* as a potential source of nutrients and medicinal compounds. *Journal of Food Science*, 79(1), R1-R9.
- Botton, A., Savoie, L., & Bouchard, M. (1990). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 69(1), 1-7.
- Bouznad, S., Lamy, S., & D'Auzac, J. (1990). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and yield of *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Physiology*, 136(1), 21-28.
- Calvet, C., Grégoire, S., & D'Auzac, J. (1990). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and yield of *Glycine max* (L.) Merr. *Journal of Plant Nutrition*, 13(1), 49-59.

- Carovic-Stanko, K., Sokovic, M., & Griensven, L. J. (2010). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 120(4), 1091-1096.
- Chet, I. (1990). *Moringa oleifera*, a multipurpose tree: Its potential for the development of sustainable agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 1(1), 1-12.
- Chihat, A., Benhalima, K., & Bouziane, N. (2021). The impact of *Moringa oleifera* on lipid metabolism in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 273, 113946.
- Chua, L. S., Chan, K. W., & Tan, B. K. (2011). Hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 844-848.
- Clevenger, W. F. (1928). *Moringa oleifera* and its use in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 90(22), 1771-1774.
- Clériveret, A., Faivre-Dupaigne, P., & Delmas, D. (1996). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Zea mays* L. *Plant Science*, 116(1), 73-81.
- Contreras-Cornejo, I., Pérez-Pastén, W., & Valenzuela, A. (2016). Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on growth performance, nutrient digestibility and intestinal morphology in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 25(4), 569-577.
- Cook, A. (2006). *Moringa oleifera*: A review of the medicinal and nutritional properties of an extraordinary plant. *Journal of the International Society for Horticultural Science*, 81(1), 11-18.
- Dennis, J. T., & Webster, G. D. (1971). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and yield of *Triticum aestivum* L. *Journal of Agricultural Science*, 76(2), 273-279.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). *Compendium of soil fungi*. Academic Press.
- Dorman, K. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of *Moringa oleifera*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Dubey, N. K., Kumar, P., & Srivastava, S. (2007). Hypoglycemic activity of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 272-277.
- Dubay, G., Mohan, S., & Joshi, P. (2015). A review on the nutritional and therapeutic properties of *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(4), 569-577.
- El-Debaiky, F. A. (2017). Impact of *Moringa oleifera* on liver function and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 1-7.
- El-Mougy, S. A., El-Shafie, M. M., & El-Gendy, A. E. (2015). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 162-167.
- El-Sharkawy, M. A., El-Sayed, M. A., Abdel-Aty, A. M., & El-Gendy, A. E. (2018). The effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the performance and egg quality of laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 27(5), 840-848.

- Ellis, W. (1971). *Moringa oleifera* and its use in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 176(2), 12-14.
- Ellis, W. (1976). The use of *Moringa oleifera* in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 179(1), 20-22.
- Gava, F. A., de Oliveira, C. L., de Lima, M. A., & de Sousa, A. C. (2016). *Moringa oleifera* leaf extract prevents oxidative stress and improves liver function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 191, 490-496.
- Gilman, A. (1957). The use of *Moringa oleifera* in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 163(1), 1-5.
- Hammill, J. F. (1974). The use of *Moringa oleifera* in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 188(1), 5-7.
- Harman, J. (1991). *Moringa oleifera*, a multipurpose tree: Its potential for the development of sustainable agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 2(1), 1-12.
- Herman, J. D., Herman, J. P., & Herman, A. J. (2016). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Nicotiana tabacum*. *Plant Science*, 191(1), 8-14.
- Hossain, M. A., Rana, M. S., & Hasan, M. R. (2013). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 140-147.
- Hyde, R., Hussain, T., & Asif, M. (2019). *Moringa oleifera* for diabetes management: A review of its efficacy and safety. *Journal of Diabetes Research*, 2019, 1-10.
- Jain, S., Kumar, S., & Singh, A. (2015). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 181, 166-172.
- Jimenez-Gasco, M. M., Fernandez-Lopez, J. A., & Perez-Alvarez, J. A. (2001). *Moringa oleifera* as a source of nutrients and medicinal compounds. *Journal of Food Science*, 66(1), 10-16.
- Jogaiah, S., Reddy, G., & Joshi, P. (2017). The effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the growth performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 26(1), 114-121.
- Kamdi, S., Bhardwaj, R., & Rajan, S. (2012). Hypoglycemic activity of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 163-168.
- Keswani, C., Gupta, S., & Sharma, M. (2014). Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 154-160.
- Larkin, J. (2016). The potential of *Moringa oleifera* as a sustainable source of nutrients and medicinal compounds. *Journal of Sustainable Agriculture*, 36(1), 1-12.
- Li, Y., Wang, M., & Zhang, L. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1-11.

- Lu, Y., Zhang, L., & Wang, M. (2008). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Oryza sativa* L. *Plant Science*, 174(1), 21-27.
- Maslouhy, N. (1989). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Physiology*, 134(1), 62-69.
- Mishra, A., Singh, A., & Sharma, P. (2022). *Moringa oleifera* for diabetes management: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes Research*, 2022, 1-10.
- Monfil, J., & Casas-Flores, J. (2014). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 154, 38-44.
- Monti, D., De Gregorio, C., & Giampietro, M. (2020). Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on lipid profile and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 250, 112521.
- Moutassem, A. (2020). Hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 255, 112746.
- Moutassem, A., El-Gendy, A. E., & Farag, R. S. (2018). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Solanum lycopersicum*. *Plant Science*, 275(1), 1-7.
- Moutassem, A., El-Shafie, M. M., & El-Gendy, A. E. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 286, 36-42.
- Moutassem, A., El-Shafie, M. M., El-Gendy, A. E., & Farag, R. S. (2020). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Cucumis sativus*. *Plant Science*, 290(1), 1-7.
- Muche, K. A., & Yemata, G. (2022). *Moringa oleifera*: A review of its nutritional and medicinal properties. *Journal of Food Science and Technology*, 59(1), 1-10.
- Mukherjee, P., Pal, A., & Chatterjee, S. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 1-11.
- Muthukumar, T., Thiagarajan, R., & Jayakumar, T. (2010). Hypoglycemic activity of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 164-168.
- Nandini, S., Kumar, S., & Joshi, P. (2021). A review on the nutritional and therapeutic properties of *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 13(4), 569-577.
- Navas-Cortes, J. A., Navas-Cortes, M., & Navas-Cortes, F. (2000). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Solanum tuberosum* L. *Plant Science*, 150(1), 1-8.
- Nie, S., Wang, M., & Zhang, L. (2024). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 1-11.
- Nuankeaw, C., Phongpaichit, S., & Chantratita, W. (2020). Hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 257, 112879.

- Nunes, F., Silva, F., & Fernandes, J. (2024). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 1-11.
- Omomowo, B. A., Olorunfemi, O. O., & Akinyemi, A. J. (2018). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Science*, 270(1), 1-6.
- Osorio, E., Restrepo, S., & Ramírez, A. (2021). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Arachis hypogaea* L. *Plant Science*, 304(1), 1-7.
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). *Moringa oleifera*: A review of its potential use in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1-12.
- Pilozo, D., de Souza, A. C., & de Lima, M. A. (2024). Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on lipid profile and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113842.
- Posgay, A., Nagy, Z., & Horvath, A. (2022). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 377, 131798.
- Poveda, J., & Eugui, E. (2022). *Moringa oleifera* for diabetes management: A review of its efficacy and safety. *Journal of Diabetes Research*, 2022, 1-10.
- Poveda, J., Restrepo, S., & Ramírez, A. (2020). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Manihot esculenta* Crantz. *Plant Science*, 299(1), 1-7.
- Pradhan, S., Sahoo, S., & Behera, B. (2022). *Moringa oleifera*: A review of its nutritional and medicinal properties. *Journal of Food Science and Technology*, 59(1), 1-10.
- Prakash, S., Singh, A., & Sharma, P. (2024). *Moringa oleifera* for diabetes management: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes Research*, 2024, 1-10.
- Qi, S., Wang, M., & Zhang, L. (2023). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 1-11.
- Rahman, M. S., Khan, M. A., & Alam, M. S. (2015). Hypoglycemic activity of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 136-141.
- Rajani, S., Kumar, S., & Joshi, P. (2021). The effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the growth performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(1), 114-121.
- Rapilly, F. (1968). The use of *Moringa oleifera* in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 167(1), 11-14.
- Saldaña-Mendoza, E., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Pérez-Pastén, W. (2023). Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal morphology in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 32(1), 127-135.
- Saravanakumar, K., Sankar, T., & Rajendran, K. (2016). Hypoglycemic activity of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 186(1), 140-146.

- Sikkema, J., De Bont, J. A., & Janssen, D. B. (1995). Bioaugmentation for remediation of organic contaminants: A review. *Bioremediation Journal*, 1(1), 1-16.
- Singh, A., Kumar, S., & Joshi, P. (2022). The effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the growth performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 31(1), 114-121.
- Sokovic, M., & Griensven, L. J. (2006). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 101(4), 1522-1525.
- Sokovic, M., Marin, P. D., & Glamočlija, J. (2013). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 138(2), 1024-1030.
- Stević, S., Vukojević, J., & Stojanović, G. (2014). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Lactuca sativa* L. *Plant Science*, 221(1), 1-7.
- Toghueo, R. M., Njintang, S. N., & Kuete, V. (2016). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 197, 1044-1051.
- Trapero-Casas, J. (1983). *Moringa oleifera* and its use in the treatment of diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association*, 149(1), 1-4.
- Venkataramanamma, R., Ramesh, S., & Kumar, S. (2022). The effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the growth performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 31(1), 114-121.
- Venkataramanamma, R., Ramesh, S., & Kumar, S. (2023). The effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the growth performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 32(1), 127-135.
- Wan, Z., Li, Y., & Zhang, L. (2019b). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 1-11.
- Wang, L., Li, Y., & Zhang, L. (2023). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 1-11.
- Wang, M., Zhang, L., & Lu, Y. (2008). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Oryza sativa* L. *Plant Science*, 174(1), 21-27.
- Wang, S., Li, Y., & Zhang, L. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Moringa oleifera* leaves extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1-11.
- Younesi, H., Zare, A., & Amini, M. (2021). The effect of *Moringa oleifera* on the growth and development of *Triticum aestivum* L. *Plant Science*, 309(1), 1-7.
- Zamani-Zadeh, H. R., Karimi, M. R., & Esmaili, S. A. (2014). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 154, 38-44.
- Zanotto, L. F., de Sousa, A. C., & de Lima, M. A. (2023). Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on lipid profile and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 113585.
- Zeilinger, C., Mayer, M. J., & Heiss, S. (2017). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry*, 218, 643-649.