



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 الابراهيمي

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

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارضوالكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Phytopathologie

Thème

Activité antifongique des métabolites secondaires de quelques espèces de *Trichoderma sp.*, isolées de rhizosphère de pois chiche (*Cicer arietinum* L) dirigées contre *Fusarium oxysporum* F.sp.*ciceris* agent de la fusariose vasculaire

Présenté par :

- LADJEL Yassamina
- BENKHALED Hadjer

Devant le jury :

Président : Mme KLALECHE Haizia (Univ : BBA).

Promoteur : Mr MOUTASSEM Dahou..... (Univ: BBA).

Examineur : Mr MERIBAI Abdelmalek..... (Univ : BBA).

Année universitaire : 2016/2017

Activité antifongique des métabolites secondaires de quelques espèces de *Trichoderma* sp., isolées de la rhizosphère de pois chiche (*Cicer arietinum* L) dirigées contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* agent de la fusariose vasculaire

RESUME

La fusariose vasculaire induit par le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) est considéré comme la maladie la plus grave qui affecte les cultures du pois chiche (*Cicer arietinum* L). Dans le but de chercher des méthodes de luttés alternatives aux pesticides chimiques, cinq espèces indigènes de *Trichoderma* (*T.atroviride*, *T.virens*, *T. polysporum*, *T.european* et *T. placentula*) ont été testées vis-à-vis le FOC *in vitro* et *in vivo*. Les résultats de l'antagonisme ont montré l'efficacité de toutes les espèces de *Trichoderma* contre le FOC, dont les taux d'inhibition varient entre 68,34% et 73,98% pour la confrontation directe, et entre 21,43% et 51,98% pour le test à distance. L'enrobage de semences de la variété ILC 32-79 sensible par les espèces de *Trichoderma*, a exprimé le pourcentage le plus élevé de réduction de la gravité de la maladie marqué par *T. virens* environ de 73,12% dont les taux de l'intensité de la maladie (AUDPC) sont variables entre 751 et 1025. Les différentes concentrations (5000, 1000, 500 ppm) de l'extrait de métabolite secondaire de cinq espèces *Trichoderma* révèlent que l'activité inhibitrice croit au fur et à mesure que la concentration augmente, où le plus grand effet est observé chez l'espèce *T. atroviride* dont, la zone d'inhibition constatée est de 57,53% avec la concentration C₁. Cependant, l'application *in vivo* des métabolites secondaires a montré leurs efficacité vis-à-vis le FOC, l'espèce *T. polysporum* est considéré comme le plus efficace, dont la valeur de l'intensité de la maladie (AUDPC) calculée est 593 pour la concentration 5000 ppm exprime une réduction de 79,29% de la gravité de maladie.

Mots clés : La fusariose vasculaire, le pois chiche, Lutte biologique, *Trichoderma .sp .*, *Fusarium oxysporum* f. sp .*Ciceris* (FOC), Métabolites secondaires, AUDPC.

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette mémoire a été effectué au département de sciences biologiques de l'université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi - BBA.

Nous tenons à remercier premièrement notre encadreur Monsieur **MOUTASSEM Dahou**, Enseignant à l'université de BBA pour avoir accepté de nous encadrer et de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire, pour son caractère de noblesse incomparable, pour sa générosité et sa grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles. Nous pourrions cordialement lui exprimé nos profonds remerciements pour son soutien et sa présence dans les moments les plus pénibles. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude pour la confiance qu'il nous a faite.

J'adresse également nos très sincères remerciements à l'ensemble des membres pour l'honneur qu'ils nous ont fait pour avoir accepté de faire partie de ce jury en acceptant d'examiner et d'évaluer ce mémoire. Soyez assurés messieurs les membres du jury de notre profonde reconnaissance pour l'attention que vous avez portée à cet mémoire et pour le temps que vous avez consacré à son évaluation.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ;

D'une façon ou d'une autre, nous ont aidés pendant l'élaboration de ce mémoire,
Certains par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques...

D'autres par leur soutien permanent et leur disponibilité...

LADJEL Yassamina & BENKHALED Hadjer

DEDICACE

A la mémoire de mon père

A ma mère, en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'elle a fait pour mon éducation ainsi que ma formation, qui m'a toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.

À mes chers frères et sœurs, pour leurs soutiens et encouragements.

À mes proches et toute ma famille.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la

Réalisation de ce modeste travail

LADJEL Yassamina

DEDICACES

Je dédie cet humble travail avec grand amour :

Je commence par exprimer ma Profonde gratitude à mes très chers parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée, leurs encouragements qu'ils trouvent le témoignage de ma profonde affection et gratitude et tous les sacrifices qu'ils ont consenti à mon égard. Je ne vous remercierais a jamais assez.

A mes deux frères que j'adore et ses femmes.

A mes chères sœurs et leurs maris, et surtout à ma sœur Anissa.

A la prunelle de mes yeux: mes neveux et mes nièces.

A mon mari et sa famille.

A ceux que j'aime beaucoup, mes chers amis.

Je termine avec la personne qui a partagée tous le travail, qui a supportée mon humeurs au moment de stresse, ma binôme et ma meilleurs amies YASMINA.

HADJER

SOMMAIRE

Résumé	
Remerciements	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralité sur le genre <i>Trichoderma</i>.....	03
1.1. Historique et taxonomie de <i>Trichoderma</i>	03
1.2. La morphologie des <i>Trichoderma sp.</i>	04
1.2.1. Sporulation.....	04
1.2.2. Germination.....	04
1.2.3. Aspect Macroscopique.....	05
1.2.4. Aspect Microscopique.....	05
1.3. Ecologie des <i>Trichoderma sp.</i>	06
1.3.1. Présence et distribution.....	06
1.3.2. Croissance <i>in vitro</i> du genre <i>Trichoderma</i>	08
1.4. Interaction <i>Trichoderma sp.</i> , /Agents phytopathogènes.....	08
1.4 .1. L'antibiose.....	08
1.4.2. La compétition.....	09
1.4 .3. Le parasitisme.....	09

1.5. Applications des <i>Trichoderma sp.</i> , comme agents de bio-contrôle.....	09
2. Métabolites secondaires.....	11
2.1. Définition.....	11
2.2. Les classes des métabolites secondaires.....	11
2.3. Les métabolites secondaires de <i>Trichoderma sp.</i>	12
2.3.1. Les Peptaibols.....	12
2.3.2. Peptides non ribosomiques	13
2.3.3. Polyketides.....	13
2.3.4. La 6-pentylpyrone.....	14
2.3.5. Autre métabolites.....	15

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique	16
1.1. Matériel fongique.....	16
1.2. Matériel végétal	16
2. Evaluation de l'effet de <i>Trichoderma</i> contre le FOC <i>in vitro</i>.....	17
2.1. Purification et obtention des cultures monospores	17
2.2. Confrontation par contact direct (Technique de double culture).....	17
2.3. Confrontation par contact indirect (effet d'inhibiteurs volatils).....	18
3. Efficacité <i>in vivo</i> de <i>Trichoderma sp.</i>	18
3.1. Préparation de l'inoculum du (FOC).....	18
3.2. Préparation de l'inoculum de <i>Trichoderma sp.</i>	19
3.3. Préparation du matériel végétal.....	19

3.4. Inoculation et traitement des graines par <i>Trichoderma sp.</i>	19
3.5. Semi des graines en pot.....	19
4. Extraction des métabolites secondaires et tests biologiques.....	20
4.1. Fermentation	20
4.2. Procédure d'extraction.....	20
4.3. Détermination de la biomasse par poids sec	23
4.4. L'activité antifongique « Préparation des concentrations »	23
4.5. Effet des métabolites secondaires des <i>Trichoderma sp.</i> , <i>in vivo</i>	23
5. Exploitation des résultats et analyses statistiques	24
5.1. Calcul du pourcentage d'inhibition.....	24
5.2. Mesure de l'Incidence.....	24
5.3. Mesure de la sévérité d'attaque.....	24
5.4. Calcul de l'Indice de Flétrissement (<i>DII</i>).....	26
5.5. Calcul de l'AUDPC (Under the Disease Progress Curve).....	26
5.6. Analyse statistique.....	26

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats	27
1.1. Résultats de la confrontation directe	27
1.2. Résultats de la confrontation indirecte.....	29
1.3. Présentation des résultats <i>in vivo</i>	31
1.4. Présentation des résultats des métabolites secondaires.....	34
1.4.1. Détermination de la biomasse par poids secs.....	34
1.4.2. Détermination des métabolites secondaires bruts des espèces de <i>Trichoderm</i> ...	34

1.4.3. Effet des métabolites secondaires sur la croissance mycélienne de FOC	35
1.4.4. Effet des métabolites secondaires sur la croissance mycélienne de FOC <i>in vivo</i>	37
2. Discussion	39
Conclusion.....	49
Références bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure .1 : Cycle biologique de <i>Trichoderma sp.</i>	5
Figure .2: Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma</i>	6
Figure. 3 : La structure de peptaibol.....	12
Figure .4 : Confrontation direct et indirect de <i>Trichoderma sp.</i> , avec l'agent pathogène sur milieu PDA.....	17
Figure .5 : Inoculation du sol par le FOC Selon la méthode de TRAPERO - CASAS et JIMENEZ-DIAZ, 1985.....	18
Figure .6 : L'enrobage des graines de pois chiche par les cinq espèces <i>T. european</i> , <i>T. polysporum</i> , <i>T. placentula</i> , <i>T. atroviride</i> et <i>T. virens</i>	19
Figure .7: Représente d'un évaporateur rotatif « l'appareil d'extraction » et un ampoule à décomptation.....	21
Figure .8 Les procédures de fermentation et de l'extraction des métabolites secondaires du <i>Trichoderma</i> avec l'acétate d'éthyle	22
Figure 9 : La confrontation directe entre (A) <i>T. placentula</i> , et <i>T. polysporum</i> (B) <i>T. virens</i> et <i>T. atroviride</i> (C) <i>T. european</i> et <i>T. atroviride</i> et le FOC avec le témoin.....	27
Figure .10: Présentation des résultats de test de confrontation direct des espèces de <i>Trichoderma</i> contre le FOC.....	28
Figure 11 : Effet des espèces de <i>Trichoderma</i> sur le FOC dans les zone de contacte. 1- enroulement 2- lyse de mycélium 3- introduction de mycélium de <i>Trichoderma</i> 4- vieillissement et formation précoce des chlamydospore.....	29
Figure 12 : La confrontation directe entre (A) <i>T. placentula</i> , et <i>T. polysporum</i> (B) <i>T. virens</i> et <i>T. atroviride</i> (C) <i>T. european</i> et <i>T. atroviride</i> et le FOC avec le témoin.....	30

Figure 13 : Présentation des résultats de test de confrontation indirecte des espèces de <i>Trichoderma</i> contre le FOC.....	30
Figure 14 : Résultats de l'effet protectif des cinq espèces de <i>Trichoderma</i> chez le cultivar (ILC32-79) inoculé par l'isolat FOC. Témoin (a) <i>T. placentula</i> , (b) <i>T. virens</i> (c) <i>T. polysporum</i> , (d) <i>T. european</i> et (e) <i>T. atroviride</i>	32
Figure. 15 : Résultats de l'effet protectif des espèces <i>Trichoderma</i> chez le cultivar (ILC 32-79) inoculé par l'isolat FOC.....	33
Figure .16: Représente la biomasse par poids sec du culot de filtrat.....	34
Figure .17: Représente le poids de mycélium de fermentation.....	35
Figure 18 : Effet des métabolites secondaires de l'espèce (a) <i>T. placentula</i> , (b) <i>T. virens</i> (c) <i>T. polysporum</i> , (d) <i>T. european</i> et (e) <i>T. atroviride</i> sur le FOC.....	35
Figure .19: L'étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des métabolites secondaires de cinq espèces fongiques de <i>Trichoderma</i> en fonction l'espèce et la concentration.....	36
Figure .20: Effet des métabolites secondaires sur la croissance mycélienne de FOC.....	36
Figure. 21: Effet du traitement de la variété ILC 32-79 par les extrais des métabolites secondaires de cinq espèces de <i>Trichoderma in vivo</i>	37
Figure. 22 : Résultats de l'effet des métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i> chez le cultivar (ILC32-79) inoculé par l'isolat FOC avec le témoin (A) <i>T. placentula</i> , (B) <i>T. polysporum</i> , (C) <i>T. european</i> , (D) <i>T. atroviride</i> et (E) les cinq espèces avec le témoin.....	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau .J: Origine géographique des isolats sélectionnés pour les études antagonistes contre le FOC.....	16
--	----

LISTE DES ABREVIATIONS

% : pourcent.

°C: Degré Celsius.

13-HPOD: 13-hydroperoxyde-diène.

6-PP: 6-pentylpyrone.

AcEt: Acétate d'Ethyle.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ADP: adénosine diphosphate

Aib: Amino-isobutyrique.

ANOVA: Analysis Of Variance

ATP: adénosine-triphosphate.

AUDPC: La région sous la courbe du progrès de la maladie

B: *Botrytis*.

Cm: Centimètre.

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

C₀: Diamètre moyen des colonies témoins.

CO₂: Le dioxyde de carbone.

COV: Composés Organiques Volatils.

DII: l'Indice de Flétrissement.

DMSO: Diméthyle solfoxide.

ETP: épidthiodioxopipérazines.

f.sp: Forme spécialisée.

F: *Fusarium*.

FOC: *Fusarium oxysporum* f.sp *Ciceris*.

g: gramme.

h: heures.

I%: Taux d'inhibition en (%).

I: incidence.

IM: L'indice de l'incidence.

ISM: L'indice moyen de gravité.

ITGC: l'Institut Technique des Grandes Cultures.

Kg : Kilogramme.

L: Litre.

mg: Milligramme.

min: minute.

ml: millilitre.

mm: Millimètre.

MSFB: Les métabolites secondaires fongiques bruts.

N° : Numéros

NRP: Les peptides non ribosomiques.

NRPS: peptides synthetases non ribosomiques.

P: *Phytophthora*.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PDB: Potato Dextrose Broth.

pH: Potentiel d'hydrogène.

PKS: polycétide synthases.

Ppm: Partie par million.

R: *Rhizoctonia*.

RM: L'indice de pourcentage de réduction.

S.: *Sclerotinia*.

S: sévérité.

T: *Trichoderma*.

tr: tours

v: volume.

µm: Micromètre.

Introduction

La culture de pois chiche (*Cicer arietinum* L) l'une des plus importantes légumineuses alimentaires cultivées dans le monde (Sharma et al., 1994). Malheureusement, celle-ci est soumise à plusieurs contraintes, essentiellement d'ordres abiotique et biotique. Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures diminuant la qualité et déperissant la qualité de pois chiche.

En effet, le flétrissement vasculaire causé par *Fusarium oxysporum* fs.p *ciceris* (FOC) est la maladie la plus destructive de la culture de pois chiche. Les pertes annuelles de rendement ont atteint 10 % en Inde (Mayer et al., 1997), 12 à 15 % en Espagne (Landa et al., 2004), 40 % en Tunisie (Navas-Cortés et al., 2000b), 10-50 % au Pakistan (Khan et al., 2001), et, entre 20- 45 % en Algérie (Maatougi et al ., 1996). Cependant, les attaques par le FOC peuvent détruire complètement la culture, quand les conditions sont favorables au développement de la maladie (Navas-Cortes et al ., 2000a).

Le FOC survit dans le sol en absence du pois chiche pour plus de six ans. Il peut également survivre dans les chaumes et les résidus plus de six ans (Nene, 1980), et peut être transmis par le sol et la semence (Haware et al. , 1986). Ces caractéristiques, rendent la lutte contre ce champignon très difficile. Différents travaux de recherche ont été développés en vue de trouver des solutions permettant de limiter les dégâts. Parmi les moyens préconisés, la lutte chimique. Cependant, les fongicides recommandés ne donnent pas toujours l'efficacité attendue. Souvent après quelques années, les produits n'ont plus aucun effet sur les pathogènes à cause de l'apparition de souches résistantes. Par ailleurs, ils ne constituent pas une solution de choix, à cause de leur effet polluant sur l'environnement, s'agissant d'un champignon du sol et de surcoût qu'ils entraînent à la production. (Roebroeck et Mes, 1998). A cet effet, la lutte biologique contre le flétrissement fusarien du pois chiche par l'utilisation d'agents biologiques, devient une méthode de lutte prometteuse.

La découverte de tels agents de lutte biologique et la démonstration de leur capacité à réduire l'incidence et la gravité des maladies ont tracé la voie à plusieurs recherches prometteuses (Bélangier et Labbé, 1994). Dans ce contexte, une attention particulière a été portée aux champignons antagonistes, principalement à cause de leur potentiel à diminuer la densité de l'inoculum des champignons pathogènes (Dennis et Webster, 1971b). Parmi les champignons antagonistes qui ont démontré un bon potentiel de lutte, *Trichoderma* sp., qui ont été mentionnées pour la première fois par VUILLEMIN en 1887 . Ce n'est toute fois qu'en 1971 que DENNIS et WEBSTER ont pu élucider les différents mécanismes d'action de ce

champignon antagoniste qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments et l'espace (Dennis et Webster 1971a, b, c).

Le présent travail, a donc pour objectif d'apporter un plus dans la lutte biologique par l'isolement des agents de lutte biologique appartenant au genre *Trichoderma*, ayant pour cible le genre *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Ce modèle de lutte biologique, sera fondé sur une analyse *in vitro* et *in vivo* sur ces microorganismes, qui s'articule sur :

- L'étude de l'effet antagoniste *in vitro* et *in vivo* de quelques espèces de *Trichoderma* vis-à-vis d'isolats phytopathogènes de *F. oxysporum* f. sp. *Ciceris*.
- Extraction des métabolites secondaires et mise en évidence de leurs activités antifongiques *in vivo* et *in vitro* contre le FOC.

La première partie de notre travail correspond à une mise au point bibliographique sur l'agent antagoniste ; *Trichoderma* sp., et leurs métabolites secondaires. La deuxième partie a notre étude expérimentale concernant les matériel et méthodes. Finalement, la troisième partie expose les résultats obtenus suivis des discussions. Ce travail est achevé par une conclusion générale.

1 .Généralité sur le genre *Trichoderma*

1 .1. Historique et taxonomie de *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* a été décrit pour la première fois par le mycologue sud-africain CHRISTIAAN HENDRIK PERSON en 1794 comme étant «une poudre farineuse enfermée dans une couverture chevelue» (Reculeau-arnoud, 2003). De cette observation a certainement découlé le nom du genre: *trikos*, en grec, signifiant cheveu. Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Samuels, 1996). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes » (Ghorri, 2015).

BISBYEN 1939, a fait une étude sur la variabilité du genre et a démontré que c'était un genre monotypique et que la seule espèce le constituant était *T. viride*. Les travaux de GUTTER et MONBASHER (1963) ont montré la variabilité du genre et c'est en 1969 que RIFAI a opté pour une classification basée sur le concept d'espèce agrégée : « une entité qui peut être définie comme des agrégations d'espèces morphologiquement très similaires et très difficilement séparables » (Rifai, 1969). BISSETT a amélioré le système de classification des espèces de *Trichoderma* en se basant sur des études morphologiques plus détaillées des anamorphes (Bissett, 1991). Il a remplacé les 9 espèces agrégées de *Trichoderma* par cinq sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) comprenant 27 espèces.

Selon BISSETT (2004); la position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp.*, se présente comme suit (Druzhinina *et al.*, 2006):

Embranchement :	Amastigomycota et/ou Eumycètes
Sous embranchement :	Ascomycotina
Classe :	Sordariomycètes
Ordre :	Hypocréales
Famille :	Hypocraceae
Genre :	<i>Trichoderma</i>

1.2. La morphologie des *Trichoderma sp.*

La morphologie de *Trichoderma sp.*, a été décrite pour la première fois par RIFAI (1969). En outre, SAMUELS *et al.* (2015) ont également fourni des observations détaillées sur les caractères morphologiques des espèces définies de *Trichoderma sp.*, (Shahzad *et al.*, 2013).

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et extensive avec une sporulation abondante sur le milieu de culture **Figure. 1**. D'après SAMUELS *et al.* (2015); la majorité des cultures de *Trichoderma sp.*, croît rapidement à des températures comprises entre 25°C et 30°C, et une bonne croissance est également observée pour 6°C et 32°C et généralement pas de croissance à 35°C. Cependant, certaines espèces poussent bien à 35°C, Cela a servi comme un critère distinctif important entre les espèces morphologiquement similaires (Samuels, 2004).

1.2.1. Sporulation

Beaucoup d'espèces de *Trichoderma sp.*, sont sensibles à la lumière et sporulent sur différents types de substrats. Ce développement s'effectue en cercles concentriques avec une alternance d'anneaux qui correspondent aux phases diurnes et nocturnes. Des recherches ont montré que l'exposition pendant 20 à 30 secondes à une lumière d'intensité 85 à 90 lux était suffisante pour induire une sporulation (Reculeau-arnoud, 2003).

Un point souvent oublié dans le phénomène de sporulation du genre *Trichoderma*, c'est la production de chlamydospores qui sont des spores de résistance, durables, le plus souvent à paroi épaisse, terminales (rare) ou intercalaires, différenciées par transformation de cellules ou d'articles du mycélium. Cette formation de chlamydospores peut être faite sur différents types de milieux: liquide ou solide, sur des extraits de sol stériles ou non et sur des débris de plantes (Reculeau-arnoud, 2003).

1.2.2. Germination

De nombreuses recherches ont montré que la germination des conidies était dépendante d'une source externe de nutriments. La réponse des conidies aux nutriments dépend de la concentration en protons et ainsi germent mieux dans des milieux acides que neutres (Papavizas, 1985)

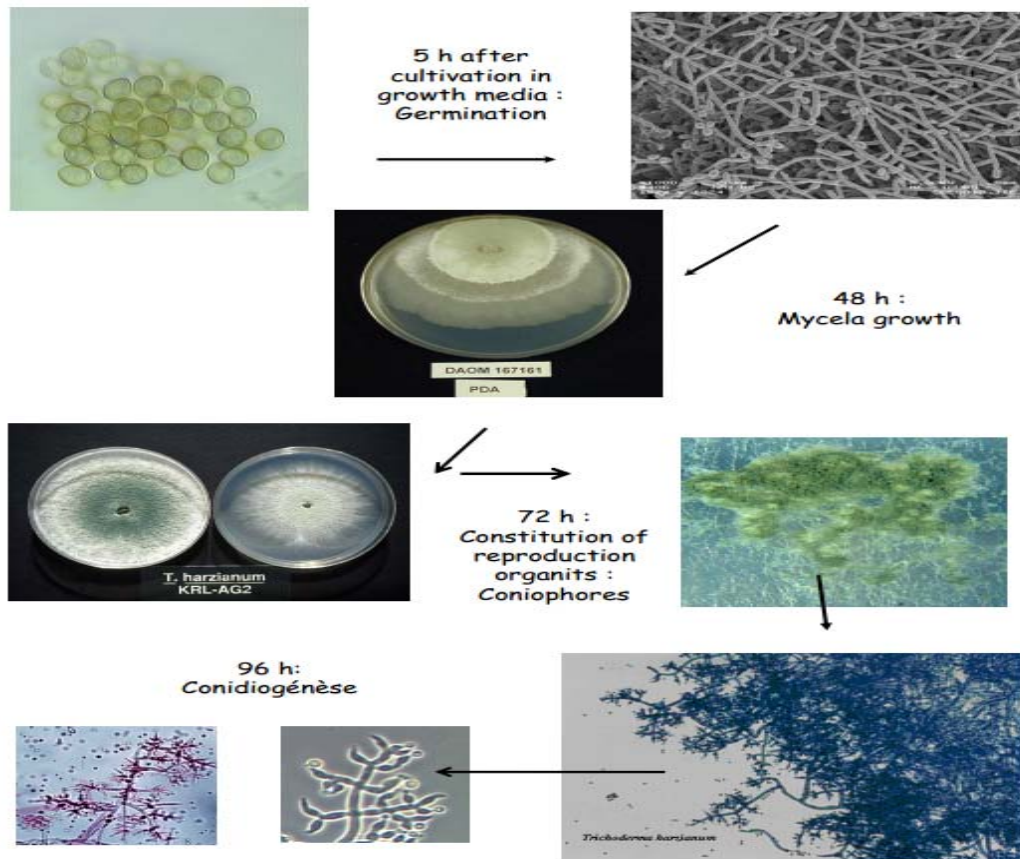


Figure .1 : Cycle biologique de *Trichoderma* sp., (Rifai, 1969).

1.2.3. Aspect Macroscopique

Il a un thalle à croissance rapide, lisse au début puis plus ou moins floconneux, souvent zoné, blanc ou vert. Ce sont les spores formées qui donnent cette couleur verte au champignon, les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides (Reculeau- arnoud , 2003).. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium. Les caractéristiques du développement du mycélium et la pigmentation peuvent être mieux observées dans un milieu riche comme le PDA (Potato Dextrose Agar) (Ghorri, 2015).

1.2.4. Aspect Microscopique

Les *Trichoderma* sp., se développent sous forme composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses d'hyphes fongiques, ramifiés un mycélium de 5 à 10 μm de diamètre. La sporulation asexuée se fait par la formation de conidies unicellulaires (3 à 5 μm de diamètre), normalement de couleur verte et libérées en grande quantité (Ghorri, 2015).

Les conidiophores des *Trichoderma sp.*, ont une forme conique ou pyramidale et poussent en touffes plus ou moins compactes et très ramifiées (Landreau, 2001). **Figure.2.** Les verticilles sont irréguliers et les ramifications s'effectuent à angle droit. Les phialides sont ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet, solitaires ou en groupes et généralement perpendiculaires à l'axe (Kubicek *et al.*, 2008). Les conidies sont réunies en glomérules au sommet des phialides. Elles sont unicellulaires, parfois hyalines, le plus souvent vertes, lisses ou granuleuses et quand elles sont jeunes, elles peuvent contenir des globules d'huiles qui disparaissent à maturité. Les chlamydospores sont très souvent globuleuses et incolores. Elles diffèrent les unes des autres par leur taille et par leur fréquence et lieu d'apparition (Reculeau-arnoud, 2003).

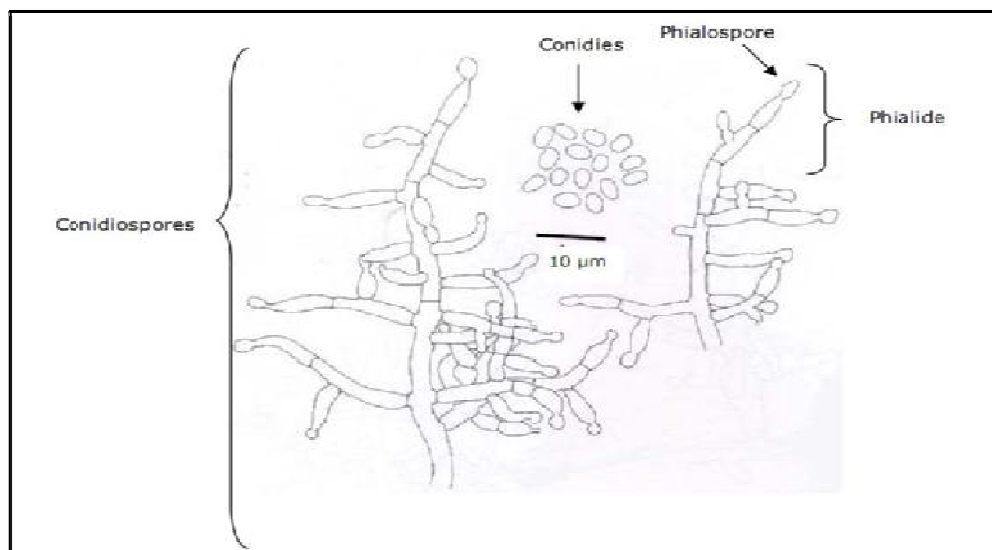


Figure .2: Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 1994).

1.3. Ecologie des *Trichoderma sp.*

1.3.1. Présence et distribution

Les *Trichoderma sp.*, sont ubiquitaires dans l'environnement et sont surtout retrouvés dans les sols forestiers. Ce sont des contaminants fréquents dans les cultures industrielles de champignons, ils peuvent également se développer sur le compost et parasiter les champignons cultivés mais aussi les sclérotés ou les propagules d'autres champignons microscopiques (Pivkin, 2000). Ils ont été rarement isolés de végétaux ou peu décrits comme endophytes bien qu'ils soient retrouvés à la surface des racines de certaines plantes. Un des substrats de choix du genre *Trichoderma* est le bois, ce qui pose notamment des problèmes de détérioration de constructions et donc entraînent des désagréments et des pertes économiques importantes. Il est cependant possible de les rencontrer chez l'homme et plus particulièrement

chez les immunodéprimés ainsi que dans les zones de stockage de papier ou les bibliothèques, posant le problème de la conservation des manuscrits (Papavizas, 1985).

Le style de vie polyvalent de *Trichoderma* est basé sur trois modes major nutritionnel: la saprotrophie, la mycotrophie et la dépendance sur les sucres dérivés des plantes. La plupart des espèces de *Trichoderma sp.*, peuvent vivre des parasites d'autres champignons (López-Bucio *et al.*, 2015).

Les *Trichoderma sp.*, sont en général considérées comme des composantes cosmopolites dans différents écosystèmes dans une large gamme de zones climatiques. Cependant, certaines espèces sont omniprésentes tandis que d'autres sont limitées à des zones géographiques spécifiques (Kubicek *et al.*, 2008).

Les membres de ce genre sont fréquemment parasités sur d'autres champignons, sur du bois et de l'écorce morts, dans le sol et la rhizosphère qui expriment leur capacité. Pour occuper diverses niches écologiques (Gal-Hemed *et al.*, 2011).

Le *Trichoderma sp.*, se développe à la surface des racines, il peut améliorer la croissance des racines par leur protection contre les agressions parasitaires et efforts physiques. En effet *Trichoderma sp.*, solubilise le phosphate et les micro-éléments qui sont impliqués dans la stimulation de la croissance végétale. *Trichoderma sp.*, a un autre mécanisme antagoniste qui est l'induction de la résistance chez la plante hôte (Ghorri, 2015).

La répartition des champignons du genre *Trichoderma* est à peu près comparable en milieu terrestre (6% des espèces) et en milieu marin (6 à 10%) (Mohamed-Benkada, 2006). Il est donc possible de soumettre l'idée que *Trichoderma* est ubiquiste et non marin stricte (Landreau, 2001).

Les *Trichoderma sp.*, sont des saprophytes omniprésents dans le sol. Ils sporulent abondamment, ont peu de besoins nutritionnels, peuvent croître rapidement et produire des gammes diversifiées de métabolites secondaires. En outre, ils ont la capacité de transformer une variété extrêmement large de matériaux organiques naturels. Ils sont bien connus comme hyper-producteurs d'enzymes de dégradation comme les chitinases et les cellulases (Benouza, 2012). Ils ont été promus indirectement comme agents de lutte biologique et stimulateurs de croissance des plantes (Papavizas, 1985). Le développement de certaines espèces de *Trichoderma sp.*, dépend également du pH du sol mais aussi de sa composition en sels, de la présence ou non de dioxyde de carbone ou de bicarbonates ainsi que de la nature et la proportion des microorganismes présents (Reculeau-arnoud, 2003).

1.3.2. Croissance *in vitro* du genre *Trichoderma*

Les *Trichoderma sp.*, font parti des champignons saprophytes et utilisent principalement pour se développer: une source de carbone et une source d'azote ce dernier à partir des composés d'ammonium et de protéines, les acides aminés ainsi que les acides gras à longue chaîne, les nitrates et éventuellement de nitrites, l'assimilation du nitrate est rare et dépend de l'espèce ;Les substrats carbonés très diversifiés comprennent une large gamme de sucres; certaines espèces peuvent utiliser l'inuline, raffinose, saccharose, acides tannique et gallique. Il est aussi nécessaire de ne pas négliger l'impact que peut avoir le dioxyde de carbone et le pH du milieu. En effet, la croissance des champignons du genre *Trichoderma* devient très rapide lorsque l'on atteint un taux de CO₂ supérieurs à 10% et un milieu alcalin, ce qui explique la relative abondance de ce genre dans des habitats humides et légèrement alcalins (Reculeau-arnoud, 2003).

1.4. Interaction *Trichoderma sp.*, /Agents phytopathogènes

Les propriétés antagonistes des *Trichoderma* sont connues depuis longtemps puisque la première publication qui en fait mention date de 1887 par VUILLEMIN. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes cultivées n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales (Johanne Caron, 2002).

La recherche sur les propriétés antagonistes de *Trichoderma sp.*, a progressé depuis la découverte en 1932 de *Trichoderma lignorum* (révélé plus tard *T. atroviride*) agissant comme un parasite sur d'autres champignons (Harman, 2011).

Trichoderma sp., a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action. En 1971, DENNIS et WEBSTER ont élucidé les différents mécanismes d'action de ce champignon antagoniste qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments et l'espace (Dennis et Webster, 1971a, b, c).

1.4.1. L'antibiose

L'antibiose est le processus de sécrétion des composés antimicrobiens par des champignons antagonistes pour lutter contre les agents pathogènes dans leurs zones de croissance (Verma *et al.*, 2007) qui résulte de la production de substances qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène (Johanne Caron, 2002).

1.4.2. La compétition

Qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma sp.*, à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes mais *Trichoderma sp.*, emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables. *Trichoderma sp.*, a une forte capacité à utiliser et métaboliser les nutriments du sol, qui le rend plus compétitif à de nombreux micro-organismes du sol (Benitez *et al.*, 2004).

1.4 .3. Le parasitisme

Qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque *Trichoderma sp.*, s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent (Johanne Caron,2002).

Un système multi-enzymatique important a été décrit chez des espèces de *Trichoderma sp.*, les cellulases , les chitinases , β -1,3 - glucanases, β -1 ,6-glucanases, β -1 ,3-glucanases et des protéases (Howell , 2003).

Trichoderma sp., possède une batterie de mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. Le déploiement des modes d'action varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (Températures, Humidité, etc...). *Trichoderma sp.*, est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive. Il permet, au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines. Le même effet est observé lorsqu'il est utilisé en pulvérisation aérienne. Une fois installée, *Trichoderma sp.*, peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (Johanne Caron,2002).

1.5. Applications des *Trichoderma sp.*, comme agents de bio-contrôle

Les *Trichoderma sp.*, présentent une activité antagoniste et d'hyperparasitisme à l'égard d'un grand nombre de microorganismes (particulièrement ceux du sol), et sont utilisés en lutte biologique à l'égard de diverses maladies sur différentes cultures, Ils peuvent jouer également un rôle dans des mécanismes de défense de la plante (Chet, 1987).

Les espèces de *Trichoderma sp.*, ont reçu une attention toute particulière du fait de leur nature: ce sont des agents de bio-contrôle des pathogènes fongiques des plantes ,ces champignons sont également utilisés pour contrôler les pathologies touchant les végétaux et

plus particulièrement les mycoses. Certaines souches de *Trichoderma sp.*, sont des mycoparasites qui s'attaquent aux spores, aux mycéliums ou aux sclérotés d'autres micromycètes. Les enzymes qui seraient responsables de la dégradation des cellules de la paroi fongique sont des enzymes chitinolytiques (Samuels, 1996).

Les *Trichoderma sp.*, sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes reliées aux sols, aussi bien que pour la dégradation de composés toxiques présents dans les sols. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation. En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont utiles pour la croissance des plantes et leur confèrent une protection contre les pathogènes. Il en résulte aussi une amélioration du contenu du sol en nutriments. La présence de *Trichoderma sp.*, dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Singh *et al.*, 2007).

La capacité de *Trichoderma sp.*, à détecter, envahir et détruire d'autres champignons été le principal trait derrière leur succès commercial en tant que biopesticides. Actuellement, plus de 60% de tous les biopesticides enregistrés contiennent un seul isolat de *Trichoderma sp.*, ou des mélanges d'espèces de *Trichoderma sp.* En principe pour une plus grande bioactivité, les espèces de *Trichoderma sp.*, utilisées plus fréquemment en biocontrôle et mieux étudiées en ce qui concerne leurs mécanismes d'action sont *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* et *T. viride*, dont la plupart présentent également une action biostimulante élevée sur les cultures horticoles, ce qui se traduit par une meilleure performance et un succès commercial (Verma *et al.*, 2007).

Néanmoins, l'utilisation d'espèces différentes dans une formulation doit être soigneusement étudiée car au moins *in vitro* différentes espèces de *Trichoderma sp.*, s'opposent mutuellement. Lorsqu'il est cultivé à la rhizosphère ou à la surface de la racine, on s'attend à ce que *Trichoderma* rencontre fréquemment des interactions avec d'autres microorganismes végétaux tels que les mycorhizes arbusculaires. En effet, de telles interactions ont été étudiées dans le passé, avec des résultats convertisseurs. Dans certains cas, l'inoculation avec les deux champignons a entraîné soit des effets synergiques positifs sur les plantes, soit une inhibition de la croissance des plantes (López-Bucio *et al.*, 2015).

2. Métabolites secondaires

2.1. Définition

Beaucoup de mycètes peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires qui se caractérisent par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui représente une structure chimique unique (Boiron, 1996).

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des champignons. Ces composés sont généralement produits au cours de l'idiophase et sont très diversifiés au niveau de leurs structures chimiques. Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres, ces métabolites, sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques, Les enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliquées, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales (Adams, 2002).

Des conditions environnementales spécifiques peuvent affecter la production des métabolites secondaires, telles que la composition du milieu de la culture, l'activité de l'eau, la valeur du pH, la température, la teneur en oxygène, et la présence d'organismes compétitifs (Johanning, *et al.*, 2002).

2. 2. Les classes des métabolites secondaires

À première vue, les structures des métabolites secondaires peuvent paraître diverses. Cependant, la majorité de ces composés appartient à une même famille, et ont des caractéristiques structurelles particulières issues de leur voie de biosynthèse. Les classes des métabolites secondaires sont (Johanning, *et al.*, 2002):

- Les polykétides et les acides gras
- Les terpenoïdes et les stéroïdes
- Les propanoïdes phényles
- Les alcaloïdes
- Les acides aminés spécialisés et les peptides

2.3. Les métabolites secondaires de *Trichoderma sp.*

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp.*, a été rapportée pour la première fois par WEIDLING (1934), et considérés comme des substances antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires processus réagi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vizcaino *et al.*, 2005), Parmi ces métabolites, on peut distinguer :

2.3 .1. Les Peptaibols

Les peptaibols sont une grande famille croissante de produits naturels linéaires biosynthétisés par de nombreux champignons. Les espèces fongiques du genre *Trichoderma* sont les principaux producteurs de cette classe de composés qui contiennent 7-20 acides aminés et ont de façon caractéristique un groupe N-terminal acylé, un amino-alcool C-terminal et une teneur élevée en acide 2-amino-isobutyrique (Aib). Les amino et iminoacides inhabituels présents dans les peptaibols comprennent l'isovaline, la b-alanine, l'hydroxyproline et l'acide pipécolique. Le premier composé de cette classe a été isolé de *T. viride* et appelé alaméthicine F30 (158). **Figure. 3** (Brewer *et al.*, 1987).

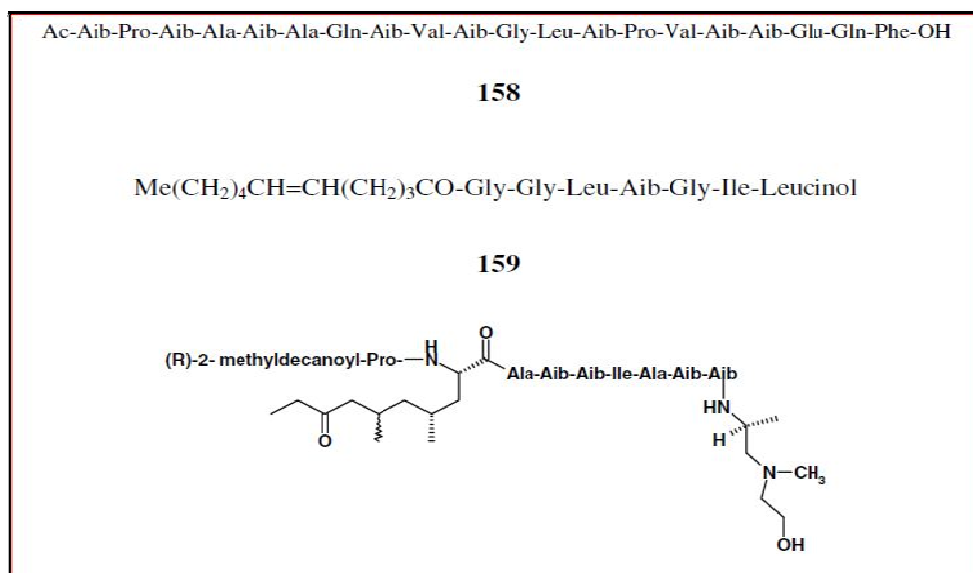


Figure.3 : Structure de Peptaibol (Reino *et al.*, 2008).

2.3.2. Peptides non ribosomiques

Les peptides non ribosomiques (NRP) constituent un grand groupe de métabolites secondaires économiquement et écologiquement importants qui résultent de la fusion de deux ou plusieurs acides aminés par des méga-enzymes multi-modulaires, connues sous le nom de peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) en dehors du ribosome. Suivie, dans de nombreux cas, de modifications secondaires. Les NRP peuvent être de longueurs différentes, contenant habituellement à la fois des acides aminés protéinogènes et non protéinogènes, peuvent être linéaires ou cycliques et comprendre des substances dérivées de champignons pharmacologiquement appropriées telles que les antibiotiques tripeptides bêta-lactames, l'immunosuppresseur cyclosporine et le peptide antitumoral terrequinone. Les principaux groupes de PNR de *Trichoderma sp.*, sont des peptaibiotiques, des épithiodioxopipérazines (ETP) et des sidérophores, les premiers étant les NRP les plus importants produits par les espèces *Trichoderma sp.* (Strieker *et al.*, 2010).

2.3 .3. Polyketides

Les polyketides sont des produits naturels d'une importance clinique et économique importante et sont impliqués dans la compétition et la communication entre les organismes. Ce groupe structurellement divers de métabolites secondaires produits par des bactéries et des champignons comprend des substances à activité antibiotique telles que les tétracyclines et les macrolides, les mycotoxines aflatoxine, l'acide fusarique et la fumonisine, les pigments bikaverine et fusarubine (Zeilinger *et al.*, 2015).

Les Polyketides sont synthétisés à partir d'unités simples comme l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA par les polycétide synthases (PKS) qui effectuent des réactions de condensation décarboxylantes successives. Les PKS sont des enzymes complexes dont la PKS fongique est composée d'au moins une cétoacyl synthase, d'une acyltransférase et d'un domaine de site de fixation de phosphopantéthine (Keller *et al.*, 2005).

Bien que les génomes de *Trichoderma sp.*, soient riches en gènes codant pour PKS, peu de travail a été fait sur la biosynthèse et la génétique des polykétides dans ces champignons. BAKER *et al.* (2012) ont présenté une analyse phylogénomique détaillée des gènes PKS de *T. reesei*, *T. virens* et *T. atroviride*, révélant que la plupart des PKS appartiennent aux clades de la lovastatine / citrinine ou des fumonisines et sont présentes comme orthologues chez les trois espèces (Baker *et al.*, 2012). Ces gènes PKS sont fréquemment regroupés avec des gènes codant pour des monooxygénases de cytochrome

P450, des déshydrogénases / réductases à chaîne courte ou des épimérasés (Schmoll *et al.*, 2016). Hormis les groupes de gènes PKS de pigment conidial, 20 nouveaux groupes putatifs de gènes PKS ont été identifiés dans les génomes de ces trois espèces (Bansal et Mukherjee, 2016a).

La suppression de *T. reesei* pks4, un orthologue des PKS formant pigment impliqués dans la synthèse de l'aurofusarin et de la bikaverine dans *Fusarium spp.*, A fourni une preuve directe que l'enzyme respective était responsable de la pigmentation verte des conidies, de la structure téléomorphe, de la stabilité des parois des cellules conidiales et Antagoniste de *T. reesei* contre d'autres champignons. De façon intéressante, la délétion de pks4 a également influencé l'expression d'autres gènes PKS du champignon. Plusieurs métabolites secondaires fongiques d'intérêt sont produits par les enzymes hybrides PKS-NRPS qui consistent en une PKS fusionnée à un module NRPS unique, dans certains cas tronqué (Schmoll *et al.*, 2016).

2.3.4. La 6-pentylpyrone

La 6-pentylpyrone (6-PP), une lactone non saturée, est responsable de la caractéristique "arôme de noix de coco" de certaines espèces *Trichoderma sp.*, et a été signalé avoir des activités antifongiques et de croissance de la plante. 6-PP appartient au groupe chimiquement divers de métabolites de bas poids moléculaire ayant une pression de vapeur élevée à température ambiante et une faible solubilité dans l'eau classée en composés organiques volatils (COV). Outre les pyrones et les terpènes, les COV dérivés de champignons comprennent principalement des alcools, des cétones, des alcanes et des alcènes qui sont produits comme produits intermédiaires ou finals du métabolisme du champignon (korpi *et al.*, 2009).

La biosynthèse des COV fongiques dépend des conditions de croissance (disponibilité des éléments nutritifs, pH du milieu, température, lumière) et est spécifique ou même spécifique à la souche. La production de COV coïncide souvent avec certains stades de développement tels que la formation de spores et certains COV sont produits en association avec des mycotoxines ; En outre, le profil COV change fréquemment pendant l'interaction antagoniste avec d'autres microorganismes ou des substances dérivées de ceux-ci .Pour plus de détails sur les COV produits par *Trichoderma sp.*, Leur biosynthèse et leur bioactivité, on se reportera aux revues récentes (Siddiquee , 2014).

Les pyrones sont dérivés des acides gras et la biosynthèse du 6-PP a été étudiée dans *T. atroviride* IMI206040 (anciennement classée comme *T. harzianum*) en utilisant l'acide

linoléique [U-14C] et [1-14C]. Il a été proposé que l'acide linoléique soit oxydé en 13-hydroperoxyde-diène (13-HPOD) suivi par la formation d'acide 5-hydroxy-2,4-décénoic par bêta-oxydation et isomérisation. Une estérification finale aboutit alors à 6-PP, qui est donc une oxylipine. Bien que la voie de la lipoxygénase conduisant à la formation d'intermédiaires 13-HPOD conjugués de l'acide linoléique soit bien connue dans les plantes, les enzymes et les gènes sous-jacents pour la production de 6-PP dans *Trichoderma sp.*, restent obscurs. Cependant, l'analyse comparative du génome a révélé un gène de lipoxygénase (ID 33350) chez *T. atroviride* mais pas chez *T. virens* et *T. reesei* qui est régulé à la hausse lors de l'interaction de *T. atroviride* avec *R. solani*. *T. atroviride* ID 33350 contient une isoleucine C-terminale et le motif WRYAK conservé caractéristique pour le groupe Ile de lipoxygénases fongiques. L'implication de l'ID 33350 dans la biosynthèse de 6-PP chez *T. atroviride* est confirmée par le fait que le 6-PP est formé par *T. atroviride* mais pas les deux autres espèces. Cependant, une expérience de délétion de gène pour confirmer le rôle de ce gène dans la biosynthèse de 6-PP est encore à effectuer (Kubicek *et al.*, 2008).

2.3 .5. Autre métabolites

Trichoderma sp., a aussi des mycotoxines et plus de 100 métabolites avec une activité antibiotique comprenant pyrones, les terpènes, les métabolites dérivés des acides aminés et des polypeptides ont été détectés dans le *Trichoderma sp.* et ont été suggérés pour être utilisés pour chimiotaxonomie de ces espèces (Kubicek *et al.*, 2008).

1. Matériel

1.1. Matériel biologiques

Le matériel biologique pathogène est représenté par un isolat de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC) ; agent responsable du flétrissement vasculaire du pois chiche. Cet isolat est originaire de la région de Mascara (Algérie), isolé à partir des tiges de pois chiche présentant les symptômes de la maladie. L'isolat est un pathotype de jaunissement et d'un morphotype cotonneux rose et représente un caractère très agressif.

Les isolats de *Trichoderma sp.*, utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir de la rhizosphère de pois chiche isolés de trois régions de l'Ouest-Est algérien. **Tableau .I**, identifié et conservé sur milieu PDA au laboratoire de phytopathologie université de Bordj Bou Arreridj.

Tableau .I : Origine géographique des isolats sélectionnés pour les études antagonistes contre le FOC.

Espèces	Origine géographique
<i>T. Placentula</i>	Skikda
<i>T. polysporum</i>	Constantine
<i>T. virens</i>	Sidi belabbas
<i>T. atroviride</i>	Sidi belabbas
<i>T. european</i>	Sidi belabbas

1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué d'une seule variété de pois chiche ILC 32-79. Cette variété nous ont été fournées par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Tiaret, où elle est multipliée chaque saison.

2. Evaluation de l'effet de *Trichoderma* contre le FOC *in vitro*

2.1. Purification et obtention des cultures monospores

Nous avons réalisé des isollements des cultures monospore. A partir des cultures âgées de 7 jours du champignon, une suspension de spores est 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. **Voire Annexe 1.** 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).

2.2. Confrontation par contact direct (Technique de double culture)

Cette technique appelée encore « technique des cultures opposées », consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélosées (6mm de diamètre), l'une portant le *Trichoderma sp.*, (antagonisme) et l'autre l'agent pathogène (FOC) (Caron J, 2002). Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 5 cm et à équidistance du centre de la boîte. **Figure .4**. chaque espèce on prépare trois répétitions (Benhamou et Chet , 1996).

L'incubation est réalisée à $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant huit jours avec une lecture des résultats chaque 48h heures et une observation de la zone de contact entre les deux protagonistes afin d'élucider le mode d'action des antagonistes.

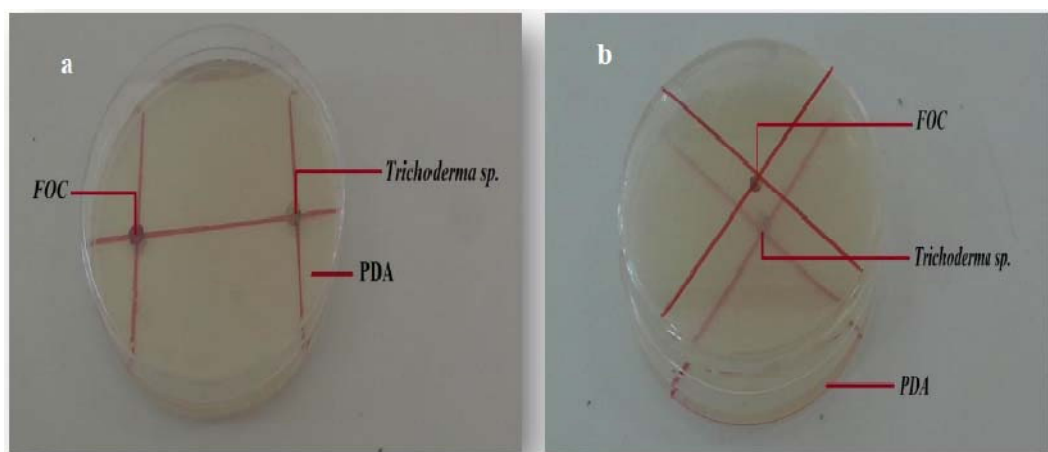


Figure .4 : Confrontation direct et indirect de *Trichoderma sp.*, avec l'agent pathogène sur milieu PDA (Originale 2017).

2.3. Confrontation par contact indirect (effet d'inhibiteurs volatils)

Le principe de cette méthode repose sur la technique utilisée par COMPORTA (1985), elle consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes, *Trichoderma sp.*, en bas et le pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles **Figure .4**. Les témoins sont représentés par des boîtes contenant à la face inférieure uniquement le milieu de culture (PDA) et la face supérieure l'agent pathogène. Les boîtes sont soumises pendant 8 jours à une température 28°C.

3. Efficacité *in vivo* de *Trichoderma sp.*

3.1. Préparation de l'inoculum du (FOC)

Selon la méthode de TRAPERO - CASAS et JIMENEZ-DIAZ 1985, dans un Erlen de 2L contenant 450 g du sable tamisé amélioré par 50g de la farine de maïs et humidifié par l'eau distillée. Le mélange est stérilisé deux fois à l'autoclave pendant 20 min à 120°C, puis ensemencée par 20 explants de 8mm de diamètre prélevé à partir d'une culture de FOC âgée de 15 jours. L'incubation de mélange a été réalisée pendant 21 jours. Une agitation périodique 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 40g d'inoculum pour 1kg de substrat, ce dernier est composé d'un mélange de sable, terre et terreau selon les proportions respectivement de 1/1/1 stérilisé deux fois à l'autoclave pendant 40 minutes à 120°C. Le semis est réalisé 15 jours après l'incorporation de l'inoculum au substrat, afin de permettre une meilleure colonisation par le FOC (Nene and Haware , 1980)

Figure.5 .

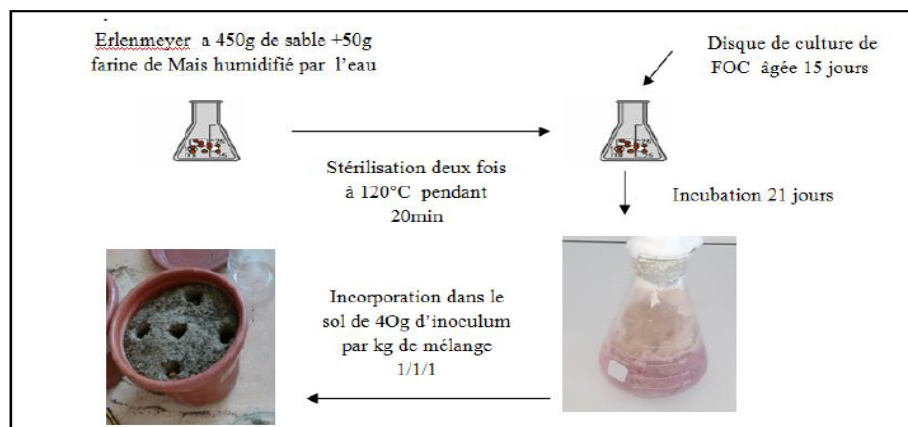


Figure .5 : Inoculation du sol par le FOC Selon la méthode de TRAPERO - CASAS et JIMENEZ-DIAZ, 1985.

3.2. Préparation de l'inoculum de *Trichoderma sp.*

Les cinq espèces de *Trichoderma* ont été cultivés dans des flacons contenant chacune 50 ml de bouillon de pommes de terre dextrose (PDB) pendant une semaine à 28°C et bien mélangé avec le milieu en utilisant un agitateur magnétique. Après filtration, la suspension de spores a été ajustée à 5×10^8 spores / ml (Belabid *et al.*, 2004).

3.3. Préparation du matériel végétal

Des graines de la variété du pois chiche, ILC 32-79 ont été désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 9 minutes afin d'éliminer toutes traces d'infections superficielles préexistantes, puis rincées une fois pendant 9 minutes dans l'eau distillée stérile et séchées entre deux papiers filtres stériles (Belabid *et al.*, 2004).

Les graines sont ensuite mises à germer pendant 4 à 5 jours à 28 °C dans des boîtes de Pétri stériles sur papier filtre humidifié avec de l'eau stérile. (Trapero-Casas, 1983).

3.4. Inoculation et traitement des graines par *Trichoderma sp.*

L'enrobage des semences de pois chiche par les cinq espèces de *Trichoderma* a été effectué selon la méthode proposée par AKLADIOUS *et al.*, (2012). Les graines de pois chiche ont été immergées dans 5 ml de la suspension sporale de *Trichoderma* pendant 30 min

Figure .6.



Figure .6 : L'enrobage des graines de pois chiche par les cinq espèces *T. europaeum*, *T. polysporum*, *T. placentula*, *T. atroviride* et *T. virens* respectivement (Originale 2017).

3.5. Semis des graines en pot

Des pots en plastique (20 cm de diamètre et 30 cm de hauteur) préalablement désinfectés par l'hypochlorite de sodium (2 %), ont été remplis par le substrat composé du mélange sol- sable- terreau (1v : 1v : 1v) stérilisés 2 fois à l'autoclave pendant 40 min à 120°C. En suite, un semis a été réalisé raison de cinq graines par pot contenant le sol infesté par le FOC (après 15 jours) et 3 pots pour chaque traitement. Les pots ainsi préparés sont ensuite placés dans laboratoire de phytopathologie, université de BBA durant une période de 40 jours et arrosés une fois par jour. Les graines non traitées, recouvertes seulement avec de l'eau, servis comme témoin (Nene, and Haware, 1980).

4. Extraction des métabolites secondaires et tests biologiques

4.1. Fermentation

La production des métabolites secondaires fongiques bruts (MSFB) est effectuée par la fermentation fongique en milieu liquide PDB .**Voir Annexe 1**, afin de repiquer régulièrement les isolats fongiques et incubé à 28 °C pendant une semaine dans le milieu PDA.

Les Cinq espèces de *Trichoderma sp .*, ainsi ayant un résultat positif, ont été mis à croître sur du PDA à 28°C pendant 7 jours, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque espèces ont été inoculées dans un Erlenmyer de 2L, contient 300 ml de PDB (Potato Dextrose Broth), stérilisés auparavant deux fois successives à 120 °C pendant 20 minutes (Xiaoling *et al.*, 2010). Le col des Erlenmeyers ont été fermés par du coton cardé et recouvert d'une feuille de papier aluminium pour éviter toute sorte de contamination. Les Erlenmeyers ont été incubés à 28°C pendant quatre semaines avec une agitation manuelle pendant quelques minutes chaque 24h (Barik *et al.*, 2010).

4.2. Procédure d'extraction

Après la période optimale de 4 semaines, le milieu a été filtré à l'aide d'un papier filtre WATTMAN N°01 pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat; qui est par la suite centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant a été récupérée est additionné par le même volume d'Acétate d'Ethyle selon la technique utilisée par BADJI *et al.*, (2005); GOGOI *et al.*,(2008); QIN *et al.*, (2009). Le mélange est agité à 120 tours/min pendant 1heurs à l'aide d'un agitateur magnétique à une température de 40°C, puis laissé dans une ampoule de décantation pour séparer la phase aqueuse à la phase organique pendant 24h. L'extraction a été faite par l'acétate d'éthyle (AcEt) ; à chaque filtrat on rajoute un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant deux heures, la solution est ensuite mise au repos dans des

ampoules à décomptation pour séparer les deux phases, et la phase organique a été récupérée pour être concentrée sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C . **Figure.7** (Xiaoling *et al.*, 2010).



Figure .7: Représente d'un évaporateur rotatif « l'appareil d'extraction » et une ampoule à décomptation (Originale 2017).

On pèse les résidus, et on les dilués au Diméthyle de Sulfoxide (DMSO) pour obtenir l'extrait brut à une concentration de solution mères 10 mg/ml à conserver à 4°C jusqu'à leur utilisation. Enfin, on a conclut par la procédure d'extraction; l'extrait brut des métabolites secondaires fongiques MSFB. **Figure.8.**

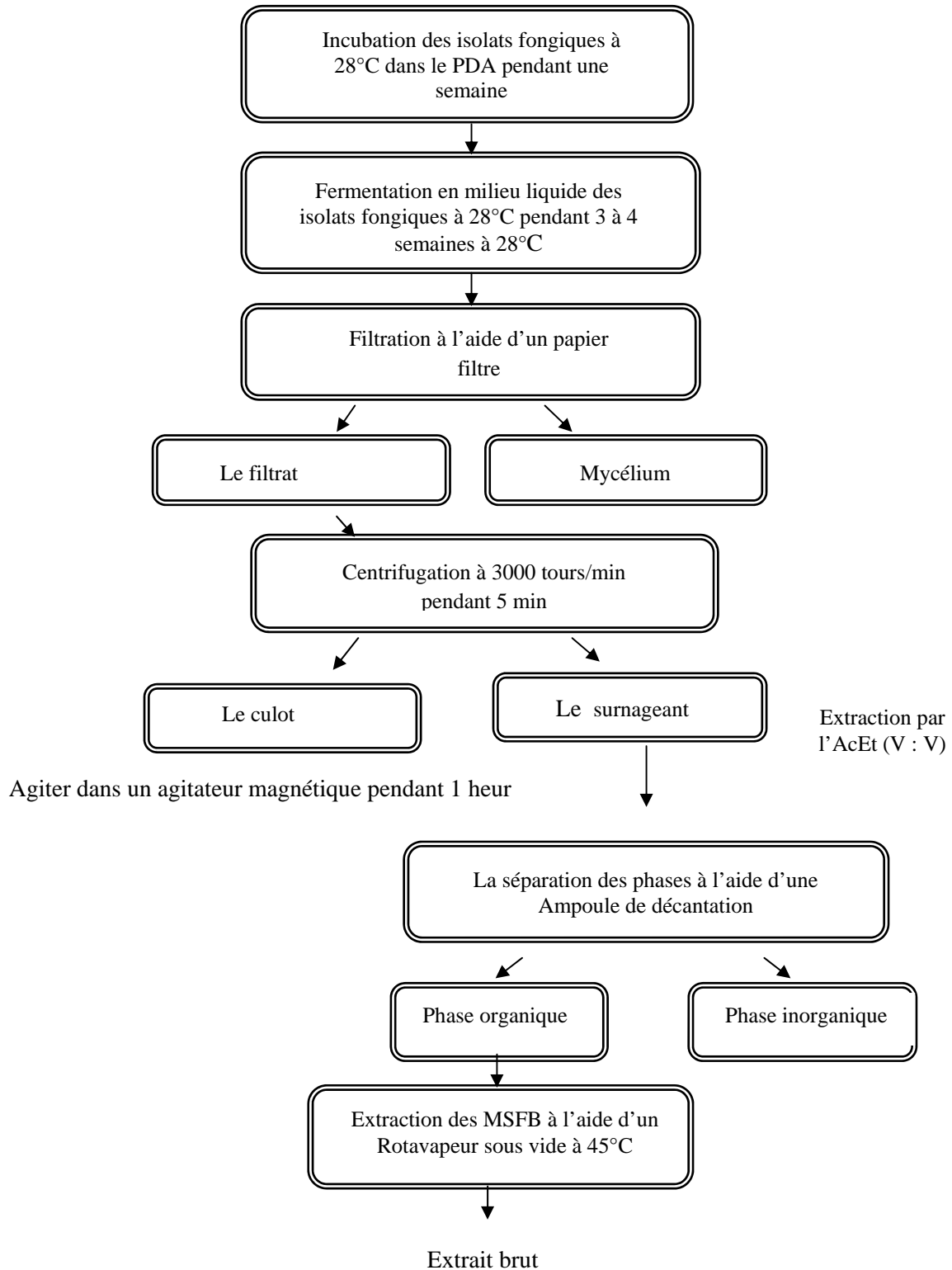


Figure .8 : Les procédures de fermentation et de l'extraction des métabolites secondaires du *Trichoderma* avec l'acétate d'éthyle (Barik *et al.*, 2010; Xiaoling *et al.*, 2010).

4.3. Détermination de la biomasse par poids sec

Pour la détermination de la biomasse par poids sec, le contenu des Erlenmeyers est fragmenté et filtré par un papier filtre N° 01 de 18.5cm de diamètres. Le mycélium est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché à 105° C, jusqu' à poids constant (Barik *et al.*, 2010).

4.4. L'activité antifongique « Préparation des concentrations »

Dans notre expérience, la technique basant sur la solubilisation directe des métabolites secondaires dans le milieu PDA, Les cinq extraits brutes ; extraits à partir de cinq espèces ont été testées avec des concentrations: 5000, 1000 et 500 Ppm. Les différentes concentrations ont été préparées par le DMSO de 3%. Après agitation des flacons, le milieu est coulé dans des boites de Pétri. Pour chaque concentrations on procède 3 répétitions.

L'inoculation se fait par le dépôt au centre de la boite d'un disque de FOC d'environ 0,6 cm de diamètre d'une pré-culture de 3 à 7 jours. Une boite de Pétri contenant 10 ml de milieu PDA sans métabolite est inoculer pour servir de témoin. Après incubation à 28°C pendant 7 jours en tenant compte de la croissance de témoin (Hazalin *et al.* , 2009).

4.5. Effet des métabolites secondaires des *Trichoderma sp.*, *in vivo*

Pour tester l'effet des extraits des métabolites secondaires des cinq espèces de *trichoderma in vivo* ; une concentration à 5000 ppm a été préparé dans un 1L d'eau distillée stérile.

Les graines de la variété du pois chiche sont désinfectées et ensuite mises a germés pendant 4 à 5 jours à 28 °C dans des boites de Pétri stériles sur papier filtre humidifié avec l'eau distille stérile.

Après germination, les graines ont été immergées dans 5 ml de chaque extrait des métabolites secondaires de *Trichoderma sp.*, pendant 30 min. et sont placées dans des pots en plastique (20 cm de diamètre et 30 cm de hauteur) ont été remplis par le substrat composé du mélange sol- sable- terreau (1v : 1v : 1v) stérilisé à l'autoclave pendant 40 min à 120°C et pulvérisé par les métabolites secondaires des cinq souches de *Trichoderma*. En suite, un semis a été réalisé raison de cinq graines par pot contenant le sol infesté par le FOC et 3 pots pour chaque traitement (Trapero-Casas, 1983).. Les pots ainsi préparés sont ensuite places au laboratoire de phytopathologie université de Bordj Bou Arreridj durant une période de 40 jours et arrosés une fois par jour. Les sols non traitées, recouvertes seulement avec de l'eau, servis comme témoin.

5. Exploitation des résultats et analyses statistiques

5.1. Calcul du pourcentage d'inhibition

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins. L'évaluation de l'inhibition exercée par les espèces fongiques est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996)

$$I \% = \frac{C_o - C_n}{C_o} \times 100$$

Où :

I (%) : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne ;

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

C_o : diamètre moyen des colonies témoins.

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

5.2. Mesure de l'Incidence

L'incidence est le moyen le plus rapide pour la mesure de la maladie ; il nécessite seulement le comptage du nombre d'unités malades qui peut être exprimé par un pourcentage du nombre total d'unités

Des estimations de l'incidence (IM) et le pourcentage de réduction (RM) de la maladie des plantes inoculées par FOC et traitées avec *Trichoderma sp.*, par rapport aux plantes inoculées uniquement par FOC ont été réalisés comme témoins. Il nous donne une idée sur l'état de la population de pois chiche vis-à-vis de l'agent pathogène.

L'incidence de la maladie (IM) a été calculée par la formule suivante (Landa *et al.*, 1997):

$$IM (\%) = (\text{NOMBRE DE PLANTES INFECTÉES} / \text{NOMBRE TOTAL DE PLANTES}) \times 100$$

5.3. Mesure de la sévérité d'attaque

La sévérité ou la gravité de la maladie est obtenue selon l'évaluation visuelle de la proportion des tissus de la plante atteinte par le flétrissement ou le jaunissement. L'échelle de

notation utilisée par TRAPERO-CASAS, (1983) a été appliquée le long de nos expérimentations. Cette échelle consiste à donner une note à la plante malade examinée en fonction de l'importance des symptômes observés :

- 0: pas de 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.

Pour estimer la gravité de la maladie, l'indice moyen de gravité (*ISM*) a été calculé pour chaque parcelle.

$$ISM = \frac{\sum n_j x_i}{n_j}$$

Où n_j : le nombre de plantes caractérisées par l'indice ;

i_j : l'indice de gravité de la maladie attribué aux plantes.

l'indice de gravité de la maladie (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996) :

$$RM (\%) = [(A - B) / A \times 100]$$

Où : **A** est l'indice de gravité de la maladie dû uniquement par FOC

B est l'indice de gravité de la maladie après une inoculation par FOC et un traitement par *Trichoderma*.

La maladie a été évaluée en fonction de la gravité des symptômes, en utilisant une échelle de notation proposée par LANDA *et al.* (1997) allant de 0 à 4; ce classement est basé sur le pourcentage de feuillage avec jaunissement ou nécrose. Cette échelle comprend (Landa *et al.*, 1997):

- **0** = 0% (plantule saine) ;
- **1** = 1-33% (léger jaunissement) ;
- **2** = 34–66% (jaunissement important des feuilles) ;
- **3** = 67–100% (jaunissement avec nécrose) ;
- **4** = mort de la plantule

5.4. Calcul de l'Indice de Flétrissement (*DII*)

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

5.5. Calcul de l'AUDPC (Under the Disease Progress Curve)

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

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

Où x_i = la proportion des tissus ou le nombre de plantes malades à toute une seule mesure (intensité de la maladie) à l'observation i ;

t : temps (jours) après l'inoculation à l'observation i ;

n : le nombre total d'observations.

La somme de régions individuelles trapézoïdes, ou régions de i à $n-1$. i et $i + 1$ représente des observations de 1 à n .

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

5.6. Analyse statistique

Trois répétitions sont retenues pour chaque facteur étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes par le test des moyennes par le test de TUKEY à 5 et 1%. L'analyse statistique a été faite avec une procédure générale des modèles linéaires avec STATISTICA 8.

1. Résultats

1.1. Résultats de la confrontation directe

Les tests de confrontation directe réalisés *in vitro*, entre les espèces de *Trichoderma* *sp.*, et le FOC ont montré une action inhibitrice de *Trichoderma* contre le FOC en culture mixte.

L'analyse ANOVA effectuée sur les résultats de test direct a montré un effet non significatif de l'espèce, un effet hautement significatif du temps et un effet non significatif pour l'effet conjugué espèce x Temps sur la zone d'inhibition. Les résultats de test direct des différentes espèces de *Trichoderma* sur le FOC en fonction le temps sont affichés dans la Voire Annexe.1.

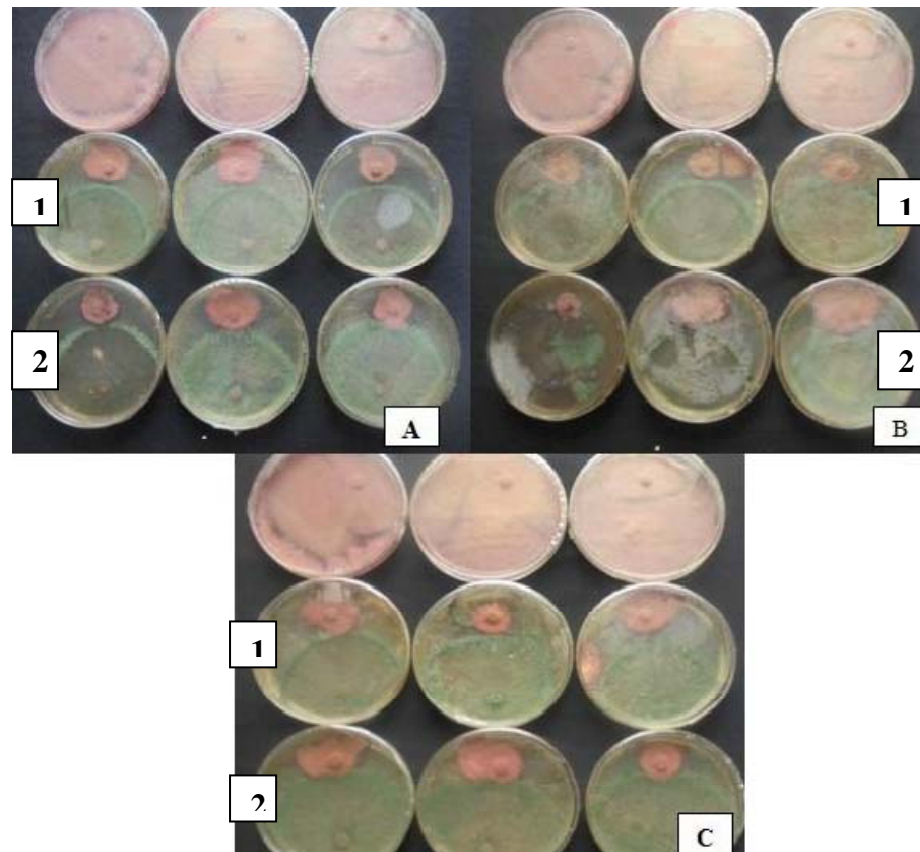


Figure .9: La confrontation directe entre (A) 1-*T. placentula*, et 2-*T. polysporum* (B)1- *T. virens* et 2-*T. atroviride* (C) 1-*T. european* et 2-*T. atroviride* et le FOC avec le témoin (Originale 2017)

L'analyse des données montrent également qu'après 2 jours d'incubation l'espèce *T. placentulaa* montre la zone d'inhibition la plus forte le environ 36,51 % et l'espèce *T. atroviride* a provoquée la plus faible environ 25,60 %. Après 4 jours d'incubation la zone d'inhibition devient de plus en plus élevée. Elle est passée de 35,12 % à 39,61% pour *T. virens* et devient la plus élevée Par contre, le pourcentage d'inhibition le plus faible a été constaté chez l'espèce *T. polysporum* environ de 26,99% **Figure 10**.

Le 6^{ème} jour d'incubation le FOC mis en contact avec le *Trichoderma* a été stagné par toutes les espèces de *Trichoderma*. Par contre, le témoin a continué sa croissance est provoqué par la suite une zone d'inhibition supérieure chez toutes les espèces de *Trichoderma*. Cette zone d'inhibition a été supérieure chez *T. virens* environ 66,16 % est inférieure chez *T. polysporum* environ à 58,34%. Le 8^{ème} jour d'incubation (**Figure.9**) a révélé l'inhibition de la croissance de FOC par les différentes espèces de *Trichoderma* a entraîné une inhibition maximale de la croissance, dont les taux d'inhibition varient entre 68,34% pour l'espèce *T. polysporum* et 73,98% pour *T. virens*.

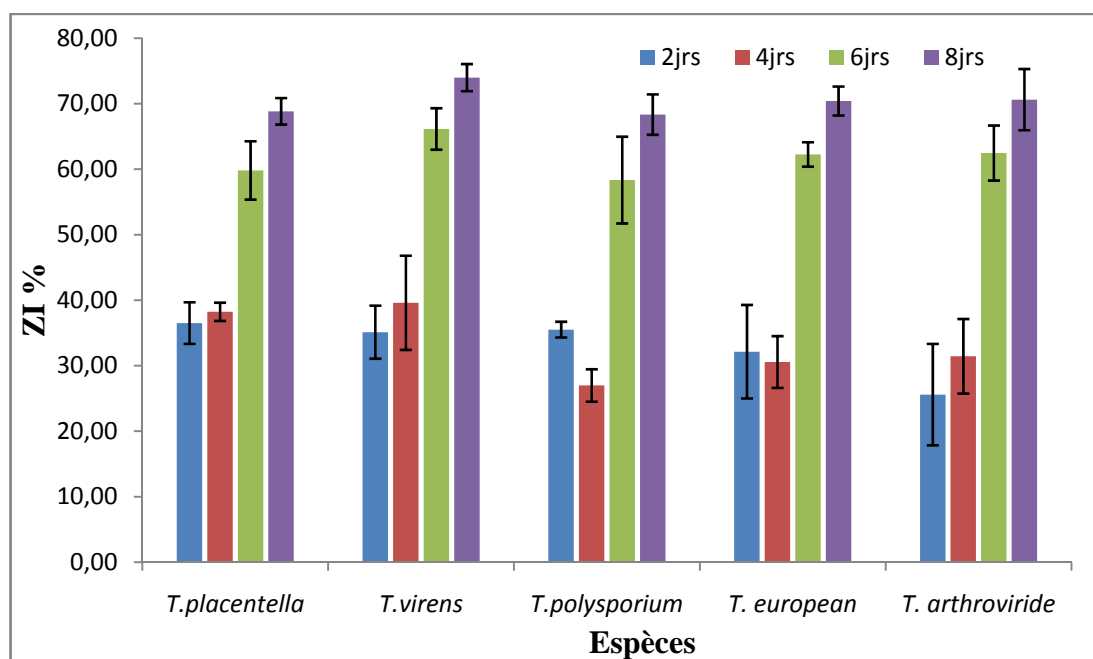


Figure .10: Présentation des résultats de test de confrontation direct des espèces de *Trichoderma* contre le FOC

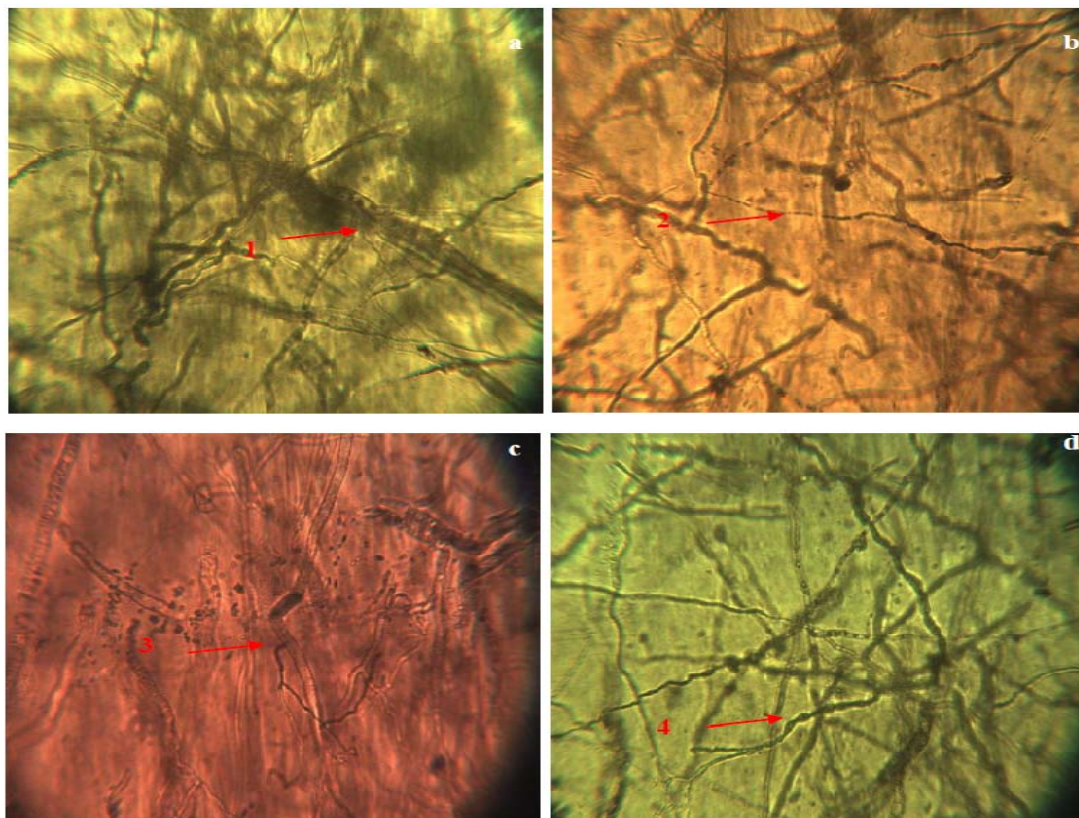


Figure.11:Effet des espèces de *Trichoderma* sur le FOC dans les zone de contact. 1(a) - enroulement 2 (b) - lyse de mycélium 3 (c) - introduction de mycélium de *Trichoderma* 4 (d)- vieillissement et formation précoce des chlamydospore (Originale 2017).

Après 8 jours d'incubation des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes (*Fusarium* et *Trichoderma*) ont montré des modifications profondes au niveau de mycélium. Un enroulement massif du mycélium du *Trichoderma* sur celui du *Fusarium* (**Figure. 11**) et une lyse des mycéliums de pathogène, une vacuolisation et une induction du vieillissement précoce par épaissement pariétal et une formation des chlamydospores.

1.2. Résultats de la confrontation indirecte

Cette méthode nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de tous les isolats de sur ceux de FOC. La réduction de la croissance mycélienne évaluée par la mesure des diamètres des colonies de ce dernier cultivé (mm) en présence et absence de *Trichoderma sp.* (**Figure .12**).

Les résultats obtenus nous ont permis de dévoiler l'effet inhibiteur de ces substances volatiles sur la croissance mycélienne du pathogène par rapport aux témoins. Comme il a été évoqué précédemment que la croissance est plus rapide chez les isolats de *Trichoderma sp.*, que chez ceux de FOC.

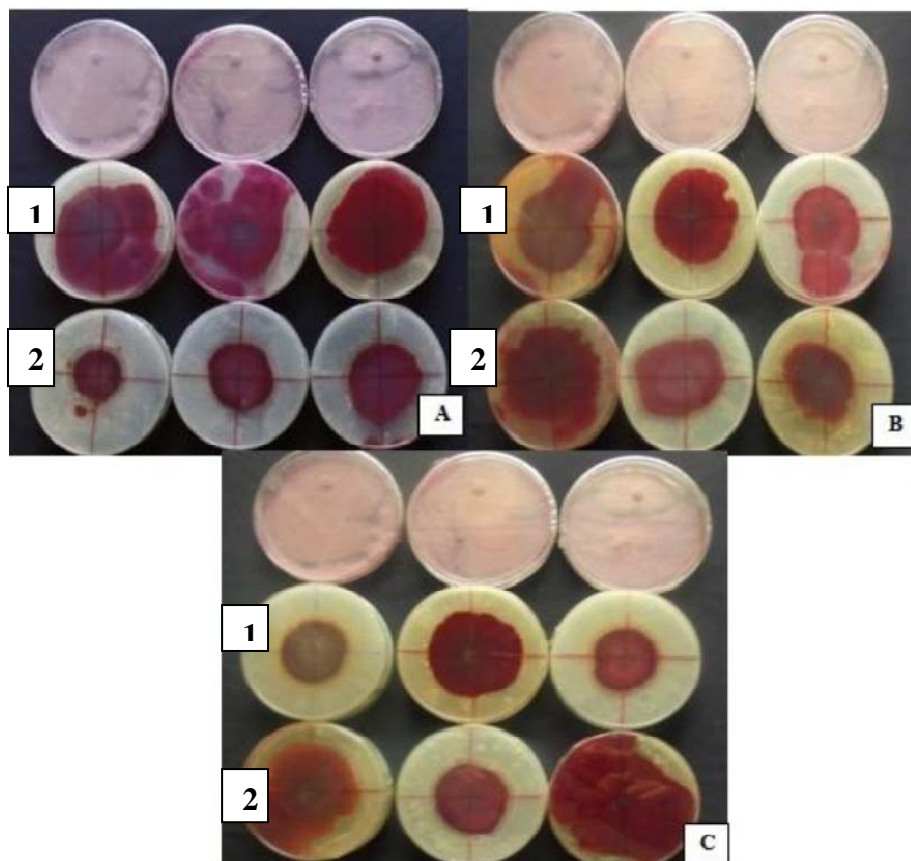


Figure. 12: La confrontation indirecte entre (A) 1-*T. placentula*, et 2- *T. polysporum* (B)1-*T. virens* et 2- *T. atroviride* (C) 1- *T. europaeum* et 2- *T. atroviride* et le FOC avec le témoin (Originale 2017).

L'analyse de la variance ANOVA a montré un effet très hautement significatif au seuil de 5% de l'espèce, un effet significatif du temps et de l'interaction entre l'espèce x le temps sur la zone d'inhibition provoquée par les différentes espèces de *Trichoderma* sur le FOC. Cet effet significatif se traduit par un regroupement des espèces en fonction de leur ressemblance vis-à-vis le taux de l'inhibition de la croissance mycélienne de FOC **Voire Annexe 1**.

Les résultats obtenus montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de FOC exercée par tous les espèces de *Trichoderma* comparativement aux témoins. Contrairement au teste de confrontation directe, dont la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps.

Les résultats illustrés par la **Figure .13** montrent que la croissance mycélienne des témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène-Antagoniste). Ainsi que, les taux d'inhibition varient de 21,43% à 51,98% selon les isolats de *Trichoderma* testés.

Après 4 jours de confrontation les résultats obtenus montrent l'existence d'une réduction du diamètre moyen des colonies de tous les isolats de FOC par rapport au témoin, la boîte contenant l'agent antagoniste est totalement envahie, alors que les isolats de FOC ne s'étalent que sur une distance de 30 à 55 mm de diamètre et provoquant une zone d'inhibition variable dont la plus faible a été noté chez *T. placentula* 25,04% et la plus élevée est constaté chez *T. virens* 40,79 %.

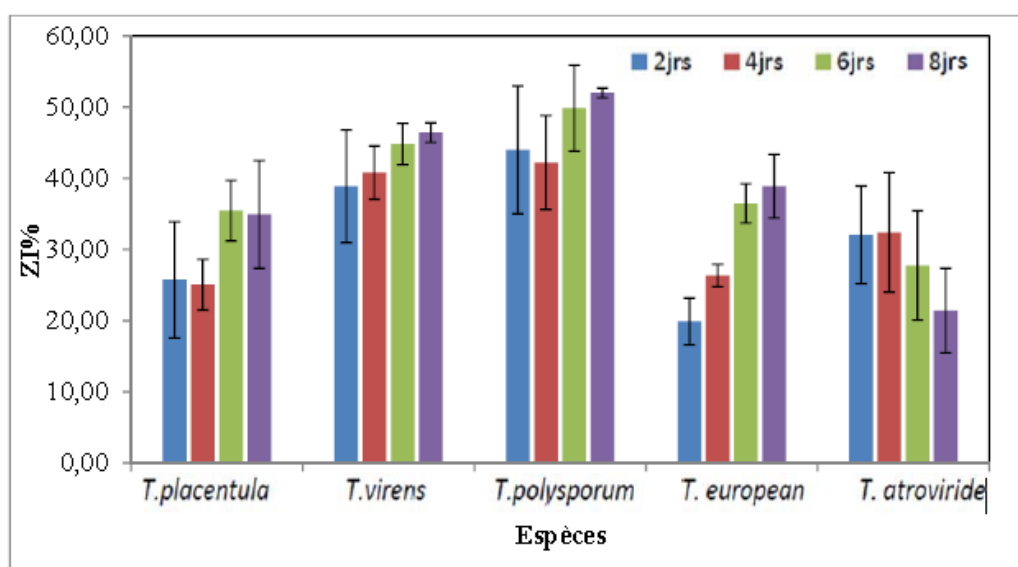


Figure .13 : Présentation des résultats de test de confrontation indirecte des espèces de *Trichoderma* contre le FOC .

Après 6 jours de confrontation, les résultats obtenus montrent l'existence d'une nette réduction du diamètre des colonies par rapport au témoin. Cela a été traduit par une zone d'inhibition variable entre 27,73 % et 49,86 %, dont la plus faible est constatée par l'espèce *T. atroviride* et la plus élevée a été enregistrée par *T. polysporum* **Figure 13**.

Après 8 jours d'incubation, une inhibition de la croissance mycélienne de FOC, s'est produite lors de la confrontation à distance. L'isolat s'avère être sensible aux substances volatiles des *T. polysporum* avec un indice antifongique environ 51,98 %. En revanche, les métabolites volatiles de *T. Atroviride* est avérée inefficace dont la zone d'inhibition calculée est très faible seulement 21,43%.

1 .3.Présentation des résultats *in vivo*

Au cours de cette expérience, l'effet protecteur des espèces de *Trichoderma* à l'égard de FOC responsable du flétrissement vasculaire de pois chiche a été testé sur le cultivar

sensible ILC 32-79. L'efficacité «*in vivo*» des cinq espèces sur Le taux de l'AUDPC a été évaluée au bout de 40 jours **Figure.14**.

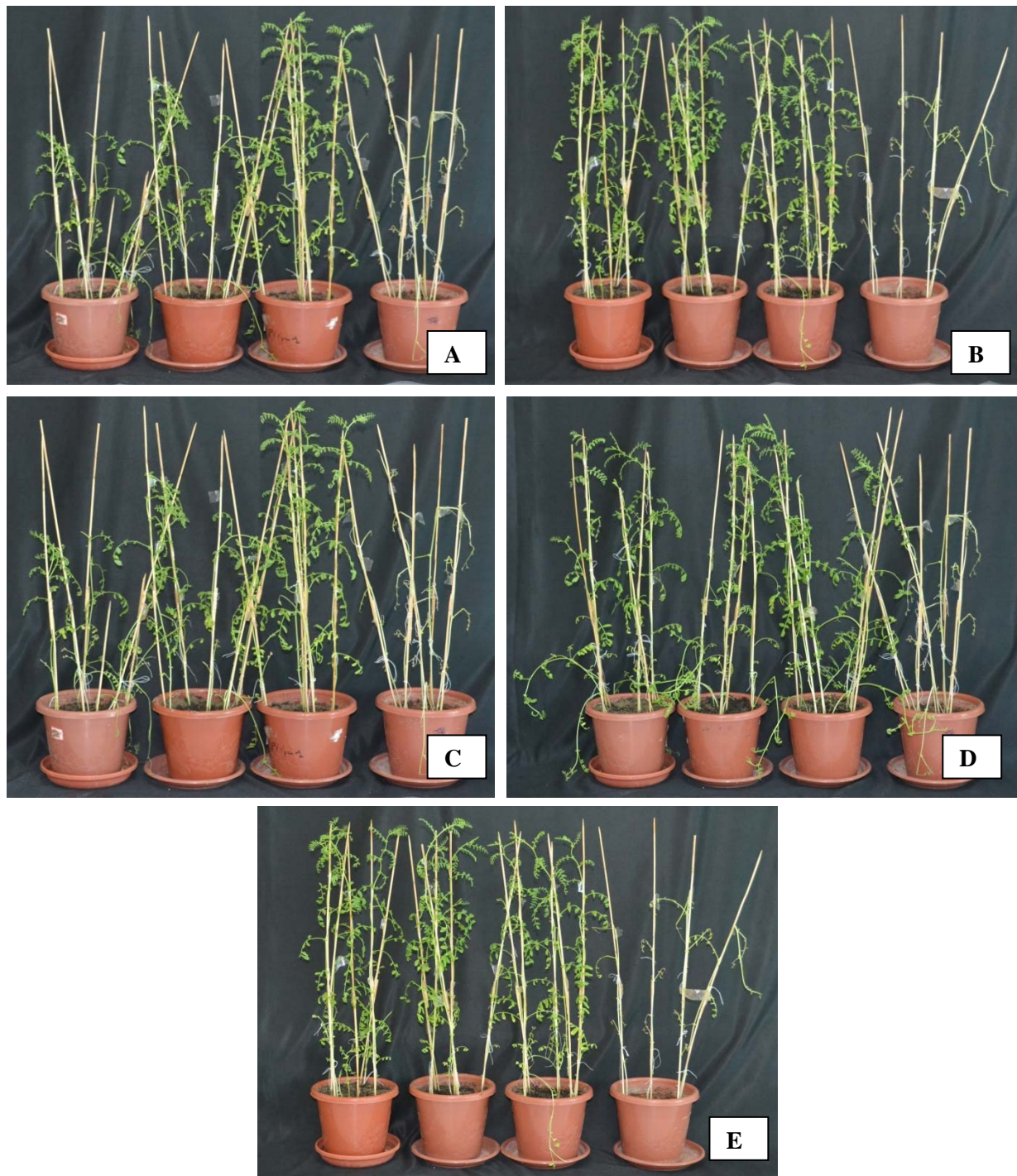


Figure.14 :Résultats de l'effet protectif des cinq espèces de *Trichoderma* chez le cultivar (ILC32-79) inoculé par l'isolat FOC avec le témoin (A) *T. placentula*, (B) *T. virens*(C) *T. polysporum*, (D) *T. europaeum* et (E) *T. atroviride* (Originale 2017).

Les résultats obtenus montrent que les 1^{iers} symptômes ont été apparus le 14^{ème} jour sur les plantules de témoin inoculées uniquement avec le FOC où nous avons observé que la maladie a été rapidement installée. Par contre, les semences qui sont enrobées par les espèces de *Trichoderma sp.* Les 1^{iers} symptômes ont été apparus le 22^{ème} jours. Les observations régulières, notées, ont montrées aussi que les symptômes typiques de la fusariose vasculaire se manifestent sous forme d'un jaunissement débutant par les feuilles basales et montant progressivement vers celles du haut.

Les analyses statistiques de type ANOVA effectuées sur les taux de l'AUDPC constatés lors de l'expérience *in vivo* montrent également une différence non significatives entre les différentes espèces de *Trichoderma* **Figure .15**. A cet effet, les valeurs de l'AUDPC enregistrées sont variables entre 751 et 1025 **Voire Annexe 2**.

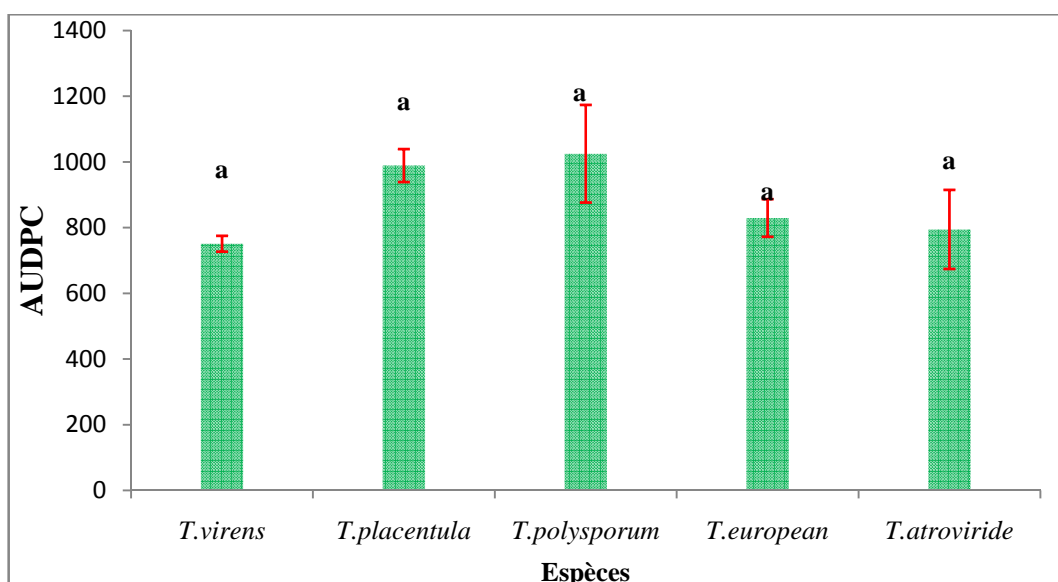


Figure. 15 : Résultats de l'effet protectif des espèces *Trichoderma* chez le cultivar (ILC 32-79) inoculé par l'isolat FOC

L'enrobage des semences de la variété ILC 32-79 par les espèces de *Trichoderma*, a exprimé une réduction de la gravité de la maladie par rapport aux semences non traité.

Cependant, les traitements des semences par l'espèce *T. virens*, a montré le taux le plus faible de l'AUDPC environ 751 et le taux le plus élevé pour *T.polysporum* avec une valeur de 1025. Ce dernier effet se traduit par une réduction très importante de la maladie estimée de 73,12% et 63,34%. A cet effet, le traitement par l'espèce *T. virens* a également montré le plus efficace et le traitement avec *T. polysporum* et le plus faible **Figure .15**.

1.4. Présentation des résultats des métabolites secondaires

1.4.1. Détermination de la biomasse par poids sec

L'inoculation du milieu PDB par les cinq espèces de *Trichoderma* ont montré une formation des anneaux transparents après deux jours de l'essai. Ces anneaux continuent son développement et devenus des amas blancs, compactées en touffes, formant un anneau irrégulier dans chaque Erlenmayer. Après 6 jours, l'anneau occupe toute la surface et devient vert (conidies) puis la couleur devient plus foncé avec le temps (vert foncé) avec certain couleur vert bleu après 14 jours.

L'analyse de l'histogramme mentionné dans la **Figure .16** montre une bonne croissance de la biomasse mycélienne de l'espèce *T. european* (3,45 g) suivie par l'espèce *T. atroviride* (2,39 g), après *T. virens* (1,67 g), après *T. polysporum* (1,65 g) et finalement l'espèce *T. placentula* (1,20 g).

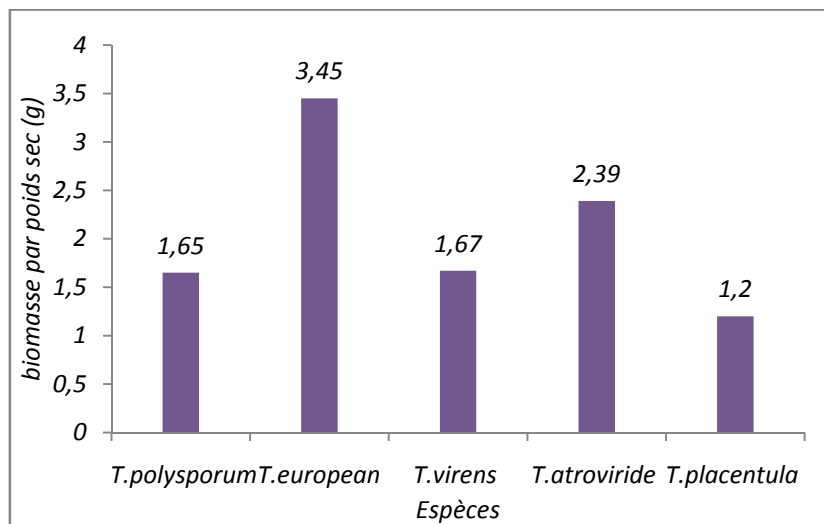


Figure .16: Représente la biomasse par poids sec du culot de filtrat

1.4.2. Détermination des métabolites secondaires bruts des espèces de *Trichoderma*

Après la filtration de la biomasse de la fermentation, elle nous a donné une phase claire jaunâtre contenant les métabolites secondaires des espèces testées. Les résultats obtenus après la pèse des métabolites secondaire produites montre qu'il y a une différence entre les cinq espèces. Cependant, *T. placentula* a produit une masse importante des métabolites secondaires environ (0,9 g), puis *T. european* (0,79 g), ensuite *T. polysporum* (0,5 g) et enfin *T. virens* et *T. atroviride* qui ont produites la même quantité (0,43 g) **Figure 17.**

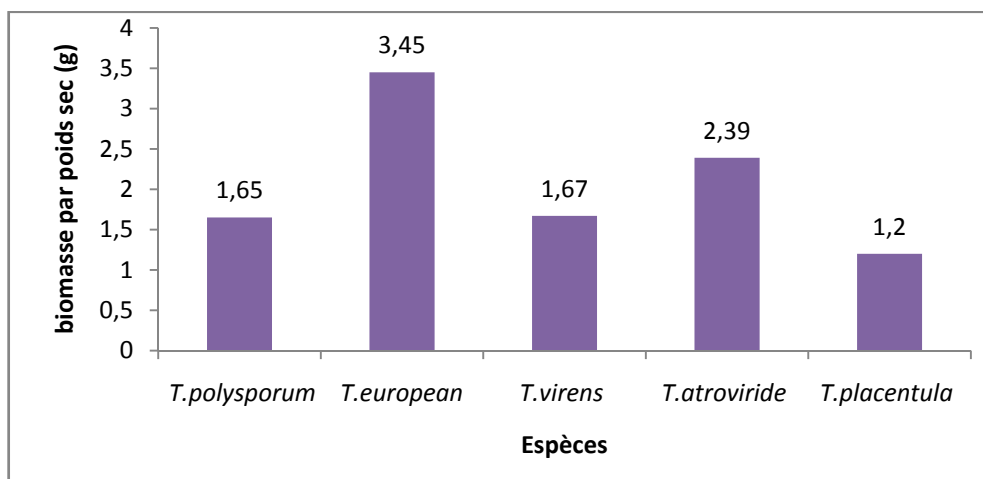


Figure .17: Représente le poids sec de mycélium de fermentation

1.4.3. Effet des métabolites secondaires sur la croissance mycélienne de FOC *in vitro*

L'analyse ANOVA effectuée sur l'effet des métabolites secondaires des cinq espèces de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne de FOC a montré un effet hautement significatif ($p < 0.0001$) de l'espèce fongique, de la dose et de l'interaction entre l'espèce et la dose. Ces résultats sont traduits par un groupement des zones d'inhibition en utilisant le test TUKEY en fonction leur efficacité **Voire Annexe 2**.

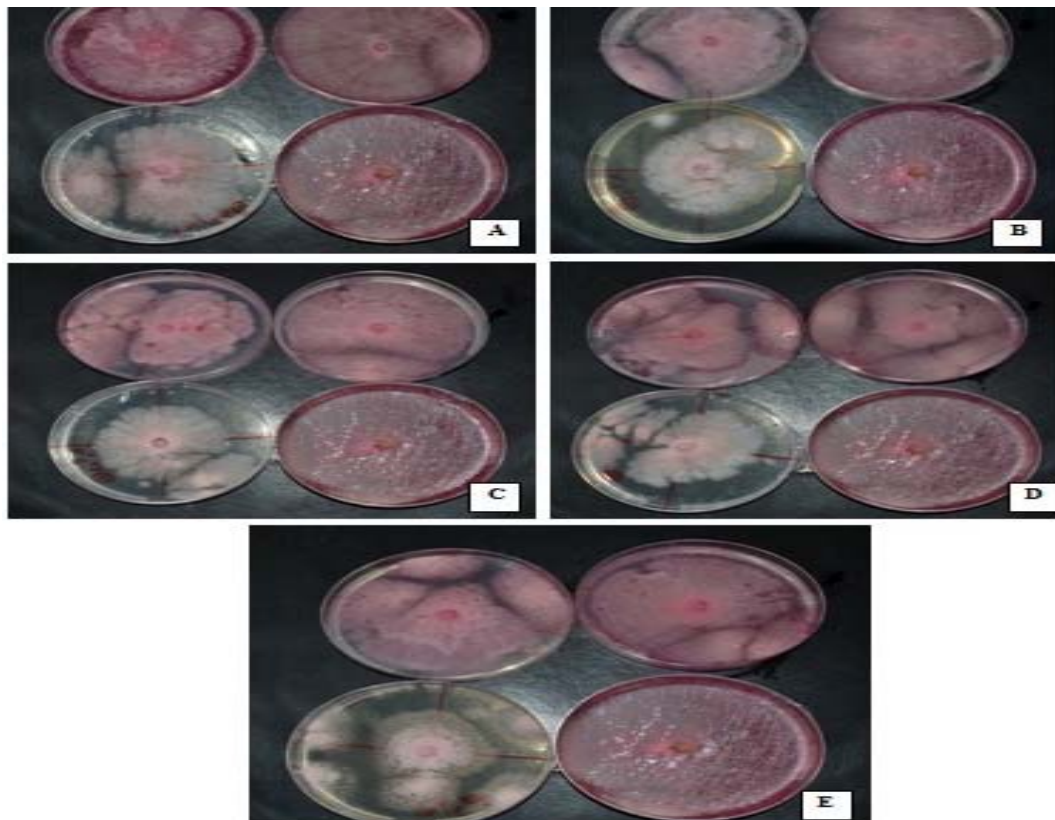


Figure .18 : Effet des métabolites secondaires de l'espèce (A) *T. placentula*, (B) *T. virens*(C) *T. polysporum*, (D) *T. european* et (F) *T. atroviride* sur le FOC (Originale 2017).

Les résultats obtenus ont démontré que, le plus grand effet des extraits fongiques est observé chez l'espèce *T. atroviride* et *T. european* où les moyennes d'inhibition ont été de supérieures à 30 %. En revanche, la zone d'inhibition la plus faible a été notée chez *T. placentula*. **Figure .18**

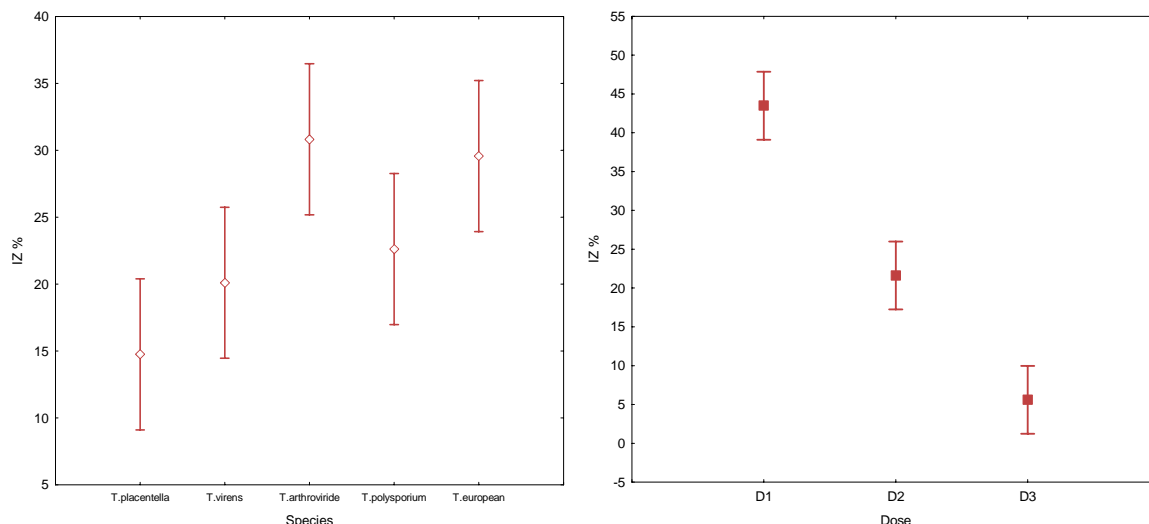


Figure.19 : L'étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des métabolites secondaires de cinq espèces fongiques de *Trichoderma* en fonction l'espèce et la concentration.

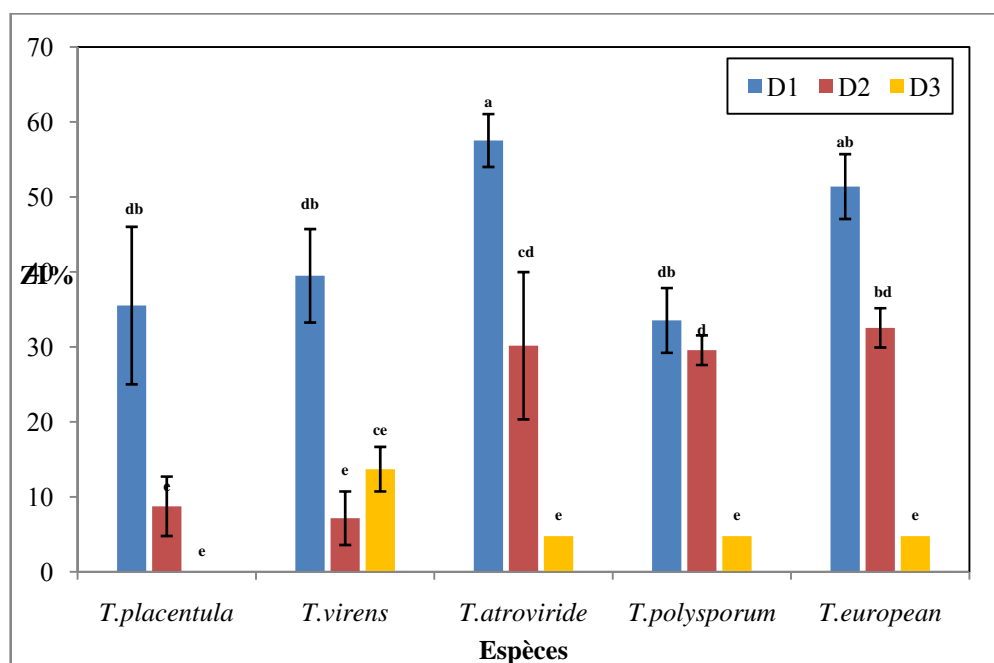


Figure .20: Effet des métabolites secondaires sur la croissance mycélienne de FOC.

Une gamme de concentration de 5000, 1000 et 500 ppm a été choisie. Elle a permis d'établir des courbes dose-effet (**Figure.19**). La courbe exprime la relation entre la dose testée et l'effet antifongique montrent une activité dose-dépendante. En général, les résultats

obtenus avec les différentes concentrations de l'extrait de métabolite secondaire révèlent que l'activité inhibitrice croît au fur et à mesure que la concentration augmente. La lecture des données présentées dans la figure montre également un gradient de la zone d'inhibition en fonction la dose. A cet effet, la dose D_1 constaté la plus efficace et la dose D_3 la dose faiblement efficace.

L'analyse de la **Figure.20** montre effectivement l'efficacité des métabolites secondaire de *T. atroviride* et *T. european*, dont la zone d'inhibition constatée est de 57,53% et 51,38 % avec la concentration C_1 respectivement. Par contre, cette dernière a été observée faible chez l'espèce *T. placentula* environ 35,51% pour les concentrations C_1 et 0% pour la concentration C_3 .

1.4.4. Effet des métabolites secondaires sur la croissance mycélienne de FOC *in vivo*

L'efficacité de cette méthode de lutte contre le pathogène (FOC) peut être amélioré par l'utilisation des microorganismes antagonistes. Le but de ce travail est de savoir si les extrais des espèces de *Trichoderma* sont capables d'éliminer ou de réduire le flétrissement vasculaire envers l'isolat de FOC testés sous les conditions (*in vivo*) **Figure 22**.

L'étude de l'effet des métabolites secondaires de cinq souches de *Trichoderma sp.*, ont montrés des résultats positifs sur la sensibilité de la souche fongique de FOC.

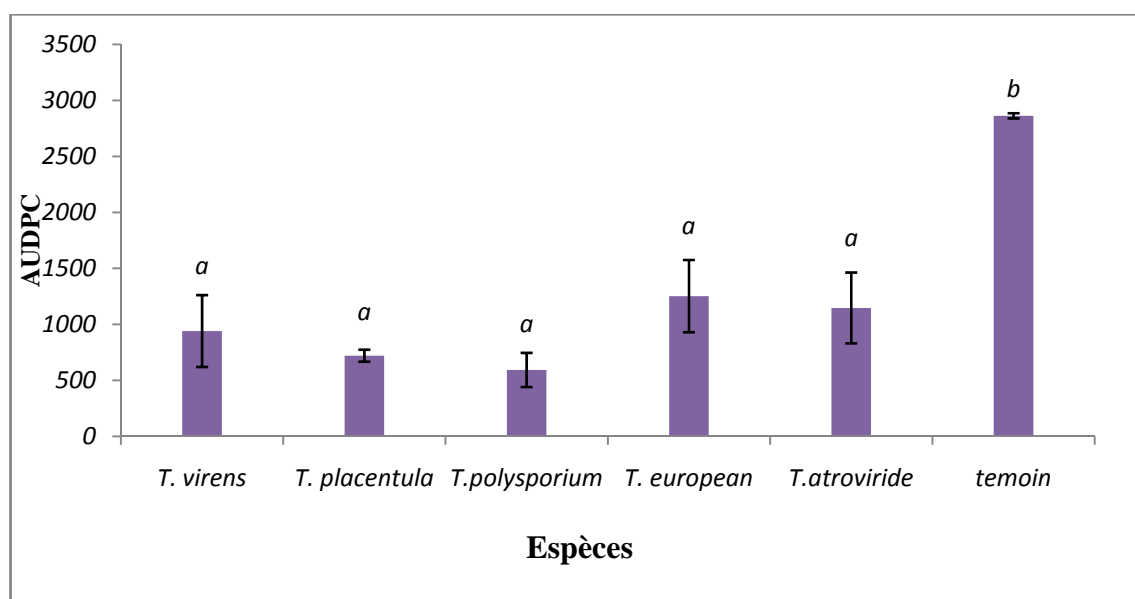


Figure.21: Effet du traitement de la variété ILC 32-79 par les extrais des métabolites secondaires de cinq espèces de *Trichoderma in vivo*.

D'après l'ANOVA, le traitement de la variété ILC 32-79 par les métabolites secondaires extraits à partir de cinq espèces de *Trichoderma sp.*, montre un effet hautement significatif.

Les résultats exprimant l'activité antifongique *in vivo* des métabolites secondaires de cinq espèces de *Trichoderma* **Figure .21**. On constate que les métabolites secondaires de *T. polysporum* sont le plus efficace contre le FOC, dont la valeur moyenne de l'AUDPC calculée est 593 pour la concentration 5000 ppm. Ce traitement a diminué la gravité de symptômes observés ainsi que la gravité de la maladie environ 79,29% comparativement au témoin non traité. Cependant, la valeur de l'AUDPC elles sont : 720,5 pour le traitement du même cultivar par les métabolites secondaires de l'espèce de *T. placentula*, 940,5 pour *T. virens*, 1146,5 pour *T. atroviride* et finalement l'efficacité le plus faible est constaté pour *T. european* avec une valeur d'AUDPC environ 1252,5.



Figure.22 :Résultats de l'effet des métabolites secondaires de *Trichoderma* chez le cultivar (ILC32-79) inoculé par l'isolat FOC avec le témoin (A) *T. placentula*, (B) *T. polysporum*, (C) *T. european*, (D) *T. atroviride* et (E) les cinq espèces avec le témoin (Originale 2017).

2. Discussion

L'utilisation excessive de fongicides chimiques peut entraîner la pollution de l'environnement et avoir pour conséquence l'émergence de pathogènes résistants aux fongicides spécifiques et, par ailleurs, sont responsables de divers problèmes de santé chez les humains et les animaux. A cet effet, une réduction ou une élimination des applications des pesticides synthétiques dans l'agriculture est fortement souhaitable. Un des moyens les plus prometteurs est l'utilisation de nouveaux outils basés sur les agents de biocontrôle. Les microorganismes antagonistes à des agents phytopathogènes ont été découverts et certains d'entre eux sont utilisés comme agents de lutte biologique contre les maladies des plantes (Gerhardson, 2002).

La recherche d'alternatives aux pesticides chimiques et l'intérêt croissant pour les méthodes de production « biologique » ont stimulé le développement scientifique des agents de contrôle biologique au cours des 20 dernières années. Des avancées ont été réalisées durant cette période au travers d'une plus grande compréhension des mécanismes de contrôle utilisés par ces agents, en particulier dans le sol. Les agents de contrôle biologique utilisés comme traitements des semences sont des micro-organismes et en particulier les *Trichoderma* protègent les semences et les semis de pathogènes variés.

Dans notre étude, les espèces de *Trichoderma* testées présentent une action antagoniste à l'égard de *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. L'observation microscopique dans la zone de contact entre les espèces de *Trichoderma* et le FOC montre effectivement un mycoparasitisme dont les mécanismes observés sont représentés par un enroulement perforation, lyse de mycélium et vacuolisation. Les différentes étapes du mycoparasitisme ont été largement discutées par plusieurs auteurs. En effet, le mycoparasitisme des *Trichoderma* implique l'enroulement des hyphes autour de l'agent pathogène, la pénétration, la production de haustoria et la lyse des hyphes. Ce phénomène, commence par un développement des hyphes en direction du pathogène, l'établissement de contact, enroulement et pénétration (Chet, 1990; Elad, 1993). Selon De OLIVIERA *et al.*, (1984) la dégradation cytoplasmique peut précéder la pénétration de l'antagoniste par la sécrétion d'enzymes telles que les citinases les B-1,3glucanase et les protéases (Harman *et al.*, 1993 ; El-Katatny *et al.*, 2001 ; De Castro *et al.*, 2010).

Cette constatation laisse suggérer que l'activité antagoniste de nos isolats contre le FOC peut être provoquée par des enzymes lytiques et des composés antifongiques.

En outre, l'hyperparasitisme peut aussi impliquer la sécrétion des enzymes de dégradation et des substances antifongiques. La production de métabolites antifongiques et d'autres composés inhibiteurs par les *Trichoderma*, a été rapportée par DENNIS et WEBSTER (1971 a et b) et TRONSMO et DENNIS (1978). Autrement, les *Trichoderma* produisent aussi des enzymes dégradant les parois cellulaires des champignons pathogènes (Elad *et al.*, 1982). Les interactions de *Trichoderma* avec plusieurs espèces phytopathogènes entraînent aussi la mort ou l'inactivation des hyphes de l'agent pathogène qui seront envahis plus facilement par les hyphes de l'antagoniste (Askary *et al.*, 1997 ; Bahous *et al.*, 2008). Selon De OLIVIERA *et al.*, (1984), la vacuolisation cytoplasmique des hyphes peut précéder la pénétration de l'antagoniste par la mise en jeu d'enzyme lytique.

Il a également été rapporté que *T. polysporum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. viridicens* et *T. viride* ont montré le phénomène de mycoparasitisme représenté par l'enroulement et par la lyse sur les hyphes de *F. oxysporum* f. Sp *ciceris* et *T. viride* est également connu pour produire certains composés volatiles et non-volatiles (Dennis et Webster, 1971). Des résultats similaires ont été obtenus par BARBOSA *et al.*, (2001), montrent également l'efficacité prononcée de l'espèce *T. polysporum* contre *Cladosporium herbarum*, dont le mécanisme impliqué et l'hyperparasitisme par l'enroulement et la lyse des hyphes de cet agent pathogène.

Nos résultats ce corroborent avec ceux obtenus par REITHNER *et al.*, (2007). Ces chercheurs ont constaté un mycoparasitisme très prononcé de l'espèce *T. atroviride* contre *B. ceneria* et *R. solani*. Des changements morphologiques profonds ont été apportés sur le mycélium de ces derniers afin de provoquer une zone d'inhibition supérieure à 75%. Cette modification a été attribuée aux sécrétions des enzymes lytiques et des composés antibiotiques. Par ailleurs, DARYAEI *et al.*, (2016) ont constaté ses résultats encourageants ont été trouvés par après le test de *T. atroviride* contre *Rhizoctonia solani*. Cette espèce provoque une inhibition de la germination et la sporulation de *R. solani* avec un taux supérieur à 65%.

En effet, l'activité inhibitrice de *T. atroviride* est due en partie à la production des endochitinases (Kullnig *et al.*, 2000), à la production d'antibiotiques (antifongiques), comprenant les antibiotiques aromatiques pyrones (Keszeler *et al.*, 2000), les peptides (Oh *et al.*, 2000).

Des résultats similaires ont été trouvés par BOUREGHDA, 2009 lors de la confrontation directe, les isolats de *T. atroviride* avec le FOC. Un pouvoir hautement parasitaire (mycoparasitisme) contre le FOC a été constaté, par leur capacité à envahir les

colonies du FOC et à sporuler au dessus. Ces mêmes isolats sont doués d'une grande capacité à inhiber la croissance lors de la confrontation indirecte (Bouregghda , 2009).

En effet les travaux de AYOUBI *et al.*, (2012) ont indiqué la potentielle activité antifongique de l'espèces de *Trichoderma* y compris *T. viride* ; *T. atroviride* et *T. virens* contre *Sclerotinia sclerotiorum*. Les résultats obtenus montrent que *T. viridescens* est le plus efficace avec une zone d'inhibition de 90% suivie par *T. atroviride* (80%); *T. virens* (60%) et *T. harzianum*(50%). Les expériences effectuées par HANSON et HOWELL, (2002) ont montré une bonne activité antagoniste de *T. virens* contre *Rhizoctonia solani* (Ayoubiet *al.*, 2012) .

BAE *et al.*, (2016) ont mis en évidence l'efficacité de *T. viridescens*, *Trichoderma virens* et *T. atroviride* contre *P. sojae* antagoniste contre *phytophthora infestens*, dont la zone d'inhibition constaté est très proche entre les trois espèces environ 56%. Quelques isolats ont montré une inhibition totale de la croissance mycélienne, parmi ces isolats *T. atroviride*, *T. virens* et *T. harzianum*.

Les composés volatiles produits par *Trichoderma atroviride* provoquent l'inhibition de la croissance mycélienne contre *P. sojae* (Ayoubiet *al.*,2012) et dont la zone d'inhibition constatée et de 49.08%. Par contre un taux très faible de la zone d'inhibition environ 6.17% a été provoquée par *T. viridescens* sur la même espèce pathogène.

Trichoderma virens a été testé dans de nombreuses expériences afin de contrôler différents champignons phytopathogènes par le test direct et indirect, tels que *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Sclerotinia spp.* et *Sclerotium spp.*, avec des résultats encourageants (Sarrocco *et al.*, 2006).

Sur la base de critères spécifiques tels que les facteurs de la masse spectrale et Les indices de rétention, les analyses faites par STOPPACHER *et al.*, (2010) ont identifiés 25 différentes substances volatiles produite par *T. atroviride*. Ces substance peuvent exercer une activité antagoniste à distance vis-à-vis une multitude de phytopathgène.

Les études antérieures ont également révélé que les métabolites antimicrobiens tels que les pyrones (Keszler *et al.*, 2000) et les peptides sont produits par *T. atroviride* (Oh *et al.*, 2000). Cependant, CHET *et al.*, (1997) ont démontré que les souches de *T. virens* produisaient une quantité très élevée d'antibiotiques à base de glioviridine.

Les taux de réduction les plus importants sont notés avec les trois isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7 et Ta.13) après une confrontation indirect avec le FOC, dont la zone d'inhibition varie entre 54 et 78% (Bouregghda , 2009).

L'efficacité de cette méthode de lutte contre le pathogène (FOC) peut être améliorée par l'utilisation des microorganismes antagonistes. Le but de ce travail est de savoir si les espèces de *Trichoderma* sélectionnés suite à la première étape de sélection *in vitro* est capable d'éliminer ou de réduire le flétrissement vasculaire envers l'isolat de FOC testés sous les conditions (*in vivo*). La suppression des maladies telluriques par les microorganismes antagonistes (champignons) *in vivo* a été rapportée par plusieurs recherches qui ont confirmé l'efficacité de cette méthode de lutte dans la protection des cultures à importance économique.

A titre d'exemple des champignons utilisés en lutte biologique comme: *Talaromyces flavus*, *Ghocladium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus giganteus*, *Penicillium chrysogenum*. Ont montré une activité contre plusieurs phytopathogènes (Whipps, 2001), notamment contre les flétrissements vasculaires causés par les différentes formes spéciales de *Fusarium oxysporum*.

D'après LINDSEY et al., (1967); YEDIDA et al., (2001), généralement, *Trichoderma* inhibe ou dégrade la pectinase et d'autres enzymes qui sont essentiels pour les phytopathogènes. En plus de son effet inhibiteur, *Trichoderma* est aussi capable d'induire une résistance localisée et systémique. L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu soit au niveau de la plante (Yedida et al., 2001), soit au niveau du sol (Chang et al., 1986; Harman, 2000).

L'induction de la résistance chez les plantes par *Trichoderma* a été étudiée et comparée avec les réponses induites par les *Rhizobactéries*. *Trichoderma* est résistante aux cyanures et produit deux différentes enzymes qui sont capables de dégrader les cyanures dans la zone racinaire (Ezzi et Lynch, 2002).

Par la suite, ce champignon peut augmenter la croissance racinaire, détruit les métabolites toxiques produits par la microflore et contrôle directement les pathogènes des racines. Des observations microscopiques sur des cultures de différents champignons ont montré que *Trichoderma sp.*, croit parallèlement avec *Rizoctonia Solani*. Toutefois, *Trichoderma* s'enroule autour du *Rizoctonia Solani* et forme des crochets empêchant ainsi le développement de celle-ci (Shalini et al., 2007).

Nos résultats sur l'effet des espèces de *Trichoderma* se corroborent avec ceux obtenus par GAVA et PINTO, (2016). Les résultats obtenus par ces chercheurs témoignent nos résultats et montrent également l'efficacité d trois espèces de *T. polysporum* et *T. viride* contre le

flétrissement vasculaire de melon. Cependant, la valeur de l'AUDPC la plus faible a été notée pour *T. polysporum* (1489) suivie par *T. harzianum* (1703.26) et *T. viride* (1739.75) comparée avec le témoin 2129.50. selon REINO et al.,(2008) l'efficacité potentielle de *T. polysporum* est due aux composés antifongiques produits par cette espèce représentés par trichosporin, cyclosporine, peptaibols, et les dérivés de cyclonerodiol. d'après WOO et al., (2014), cette espèce constitue la base des plus anciens biofongicide de *Trichoderma*, Binab-T, enregistrée dans l'Europe pour les fraises et d'autres cultures.

L'essai *in vivo* par traitement de la semence du pois chiche avec les agents antagonistes a conduit à une réduction significative de l'indice de maladie avec tous les isolats par rapport au témoin non traité, et ceci aussi bien dans le sol stérilisé que le sol non stérilisé. Les taux de réduction les plus élevés sont obtenus avec les isolats de *T. atroviride* (Ta.3, Ta.7, Ta.13) avec un taux de réduction supérieur à 54% et inférieur à 82% dans un sol non stérilisé.

En effet les travaux d'OJAGHIAN, (2011) ont montré la réduction de l'incidence de la maladie de l'espèces de *Trichoderma* contre *Sclerotinia sclerotiorum*. Les résultats obtenus montrent que *T. viridescens* est le plus efficace avec une incidence de 27% suivie par *T. atroviride* (35%) et *T. virens* (23%).

DUBEYA et al., (2013), ont conclu l'effet significatif de *T. atroviride* contre *B. ceneria* *in vitro* et *in vivo*. Ces auteurs ont montré expérimentalement que cette espèce implique deux mode d'action ; par antagonismes direct et indirect par l'induction des mécanismes de défenses de la plante.

BOUREGHDA et BOUZNAD, (2008) ont utilisé le traitement de la semence par les isolats de *Trichoderma sp.*, Avant le semis dans un sol préalablement infesté par le FOC a abouti à une réduction significative de l'indice de maladie par rapport au témoin non traité. L'indice de maladie le plus faible est obtenu avec l'isolat *T. atroviride*, avec un pourcentage de réduction 83,92% de l'indice de maladie par rapport au témoin. Les isolats les plus efficaces dans la protection des plants de pois chiche contre la maladie sont les trois isolats de l'espèce *T. atroviride* ainsi que l'isolat *T. harzianum*. Parallèlement à la réduction de l'incidence de la maladie, une stimulation de la croissance végétale du pois chiche est observée concernant la hauteur de la tige, le poids frais et le poids sec de la partie aérienne sous l'effet des isolats de *Trichoderma sp.*, utilisés.

HIBAR et al., (2005) ont montré l'effet inhibiteur *in vivo* et *in vitro* du *T. harzianum* sur le développement du *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. L'enrobage des

semences de tomate à l'aide de cet antagoniste a réduit de 80 % l'attaque de la fusariose des racines et du collet de la tomate. De plus l'application de *T. harzianum* dans le substrat de culture réduit significativement l'incidence de la maladie durant la saison de culture et par conséquent une augmentation significative de (18,8 %) du rendement total est obtenue.

Dans ce même sens, YEDIDIA *et al.*, (1999) ont rapporté que l'application de *T. harzianum* à une culture hydroponique de melon a entraîné un meilleur développement des plants traités par rapport aux plants non traités par le *Trichoderma*. Cela s'explique par une activation du système de défense de la plante, une augmentation de l'activité chitinase et peroxidase et un accroissement de l'activité enzymatique dans les feuilles induisant ainsi une résistance systémique chez ces plants.

La littérature a mentionné que les métabolites secondaires importants de *Trichoderma sp.*, sont principalement des enzymes et des molécules bioactives métabolites non volatiles diffusibles: polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines (Blumenthal, 2004). BRAIN et MC GOUWAN, (1945), ont décrit la production de viridine, une substance fongistatique et hautement fongitoxique par l'espèce *T. viride*. GODETFREDSSEN et VANGEDAL (1965) ont rapporté la production de Trichodermine, un sesquiterpénoïde par les *Trichoderma sp.*, Selon DENNIS et WEBSTER (1971), l'espèce *Trichoderma viride* produit la Trichodermine. D'après DENNIS et WEBSTER (1971), les *Trichoderma* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous formes des substances volatiles importantes.

Leur production dépend des conditions environnementales régissant des facteurs intrinsèques et extrinsèques (composition des substrats naturels, température, pH, taux d'oxygène et le dioxyde de carbone, compétitivité microbienne...) (Frisvad et Samsom, 1991) donc ces informations peuvent être des explications pour la différence *Trichoderma sp.*, Produit typiquement une gamme chimiquement diverse de métabolites secondaires, dont les propriétés antimicrobiennes de ces composés ont été bien démontrées dans de nombreux cas par les tests *in vivo* et *in vitro*. Ces composés ont prouvé leurs efficacités contre plusieurs agents phytopathogènes. Le composé 6-pentyl-2H-pyran-2-one a montré une action bioactive contre *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Scarselletti et Faull, 1994). Ce composé a également permis de réduire la pourriture des kiwis stockés provoqués par *Botrytis cinerea* (Poole *et al.*, 1998). Le viridépyrone a montré une activité antagoniste contre *Sclerotium rolfsii*, alors que la massoilactone et le δ -décanolactone ont été décelées

comme des inhibiteurs potentiels contre *B. cinerea*, *Phytophthora spp.*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans* (Hill *et al.*, 1995; Evidente *et al.*, 2003; Kishimoto *et al.*, 2005).

En effet, la production des antibiotiques par les espèces de *Trichoderma* est loin d'être exhaustive et la liste des antibiotiques nouvellement identifiés chaque année ouvre de nouvelles portes pour une utilisation ultérieure des espèces de *Trichoderma* en tant qu'agents de lutte biologique.

Toutefois, la fonction de nombreux métabolites secondaires doit encore être identifiée et la tâche est une seule espèce de *Trichoderma* est susceptible de produire des métabolites secondaires très diversifiées et spécifiques. L'importance écologique de la plupart des métabolites secondaires est également mal comprise et des recherches supplémentaires sont encore nécessaires dans ce domaine afin de mieux comprendre l'écologie de *Trichoderma* (Keswaniet *al.*, 2014).

Les complexes de pyrones tels que les koniginins A et B ont montré activité antifongique contre tous les champignons *Gaeumannomyces Graminis var. Tritici* (Ghisalberti et Rowland, 1993), alors que la koniginine D a inhibé la croissance de *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium middleonii*, *F. oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* et *R. Solani* (Dunlop *et al.*, 1989). De même, la viridine, une composé avec un large spectre antifongique à empêché la germination des spores de *Stachybotrysatra*, *Aspergillus niger*, *Penicillium Expansum*, *Colletotrichum lini*, *Fusarium caeruleum* et *Botrytis allii* (Brian et Mc Gowan, 1945). En outre, les viridifungins ont montré une activité microbicide contre *Candida*, *Aspergillus* et *Cryptococcus spp.* (Harris *et al.*, 1993). L'application de l'harzianopyridone a exposé une activité antifongique puissante contre *R. solani*, *B. cinerea* (Dickinson *et al.*, 1989), *Pythium ultimum* et *G. graminis Var. Tritici* (Vinale *et al.*, 2006). Les métabolites secondaires tels que T22-azaphilone, harzianolide et T39 buténolide spécifiques des souches de *Trichoderma* ont inhibés *R. Solani*, *P. ultimum* et *G. graminis var. Tritici* *in vitro* (Almassi *et al.*, 1991; Vinale *et al.*, 2006).

TACHIKAWA *et al.*, (2006) ont montré que le *T. polysporum* produit assez des métabolites secondaires dans le plus important et Trichosporin (TS) -B-VIa, a fungal aminoisobutyric acid (Aib); lipopeptidols, trichopolyns (Lida *et al.*, 1999); Anthraquinones from; Sesquiterpenoid (Adams et Hanson, 1972). Selon AMALINA ADNAN *et al.*, (2015) le *T. atroviride* produit une multitude de métabolites secondaires, tels que aphanthalene-1,2,8-triol, sulfuric acid mono-[2-(toluene-4-sulfonyl)-ethyl] ester.

T. virens produit une variété de métabolites secondaires y compris la viridine et le viridiole (Mukherjee *et al.*, 2006). Ces composés ont également des propriétés agricoles car la viridine est un composé antifongique, alors que (Howell et Stipanovic, 1984; Jones et Hancock, 1987).

BAE *et al.*, (2016) ont signalé l'importance des métabolites secondaires dans la limitation de la croissance mycélienne de plusieurs isolats de phytophthora. Des modifications profondes ont été observées lors de l'application des extraits de *Trichoderma*.

Les résultats obtenus par SUBHANI *et al.*, (2013) montrent l'efficacité de *T. harzianum* dont la réduction de l'incidence de la fusariose vasculaire de pois chiche. L'inoculation d'une variété sensible par cette espèce a permis une réduction 67. 93% de l'incidence de la maladie.

Les même résultats obtenus par TRIVEDI *et al.*, (2013) après le traitement des variétés sensibles avec plusieurs souches de *Trichoderma* et parmi *T. herzianum* et *T. viride*. La fréquence de la maladie a été réduite de 23 jusqu'à 53.5% selon la souche.

IRUM, (2007) a signalé que les résultats de la suppression du flétrissement vasculaire du pois chiche en utilisant les microorganismes sont plus efficaces qu'en utilisant le carbendazim ou le bénomyl, qui sont deux produits chimiques très efficaces contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par MOUSSAOUI, (2010), DUBEY *et al.* , (2011). En outre, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino *et al.* , 2005). Selon VINING, (1990), ce processus est régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées.

Les *Trichoderma* produisent typiquement des molécules bioactives qui peuvent influencer les interactions plantes/agents pathogènes. 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 pour une niche nutritionnelle. En effet, certains de ces composés ont été trouvés à jouer un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies des plantes et utilisés dans le monde entier pour la protection des cultures et de la bio-fertilisation. En plus les 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. En effet, Champignons appartenant au genre *Trichoderma* sont des producteurs de métabolites secondaires bien connus avec une activité directe contre les agents phytopathogènes et leurs composés qui affectent sensiblement le métabolisme de la plante (Vinale *et al.*, 2014).

Plusieurs espèces de *Trichoderma*, ainsi que de nombreuses substances chimiquement différentes, ont été trouvées pour être en mesure de modifier le développement des plantes et le rendement des cultures. Un effet des composés antimicrobiens spécifiques ayant ces caractéristiques antifongiques ont été détectées dans les cultures de *Trichoderma*. En fait, le traitement avec les métabolites secondaires issus de *Trichoderma* produit des changements importants de métabolisme de végétale, en agissant sur des voies spécifiques impliquées dans la synthèse des principales hormones, la résistance à stress biotiques et abiotiques et l'absorption des éléments nutritifs (Vinale *et al.* 2006; Vinale *et al.*, 2012; Prasun *et al.*, 2012).

NAVAZIO *et al.*, (2013) ont réalisé une étude cytologique sur l'interaction *T. atroviride* au sein de la plante Glycine max L. les résultats obtenus par cette étude montrent également une activation prononcée des mécanismes de défense de la plante. Cette activité se traduit par une activation de transport de Ca^{++} et la libération des formes réactives de l'oxygène dans les cellules. Le premier composé sert pour la signalisation cellulaire et le deuxième composé comme une forme phytoalexines utilisés principalement dans les mécanismes de résistances des plantes.

La capacité de certaines espèces de *Trichoderma* pour lutter contre les maladies est représenté par la stimulation de leur croissance et sa explique leur utilisation à long terme comme agents de lutte biologique lors de la culture de nombreuses cultures (Schubert *et al.*, 2008). En effet les recherches menées par BAE *et al.*, (2016) confirment les capacités de quelques espèces de *Trichoderma* et compris *T. atroviride*, *T. virens* et *T. harzianum* à limiter la croissance de la maladie ainsi l'amélioration du développement de la plante. Les analyses effectuées sur la physiologie cellulaire après le traitement montrent également un changement dans la composition cellulaire telle que la quantité de b-1,4-glucane cellulose synthéses. Ce dernier composé joue un rôle déterminant dans la tolérance de stress osmotique provoqué par les formes d'oxygène (Zhu *et al.*, 2011). En effet, HEGUERA et BEAUGE, (1997) ont rapporté que l'ATPases transmembranaires est une classe d'enzyme liée à la membrane plasmique qui catalyse la décomposition de l'ATP en ADP, ce qui conduit à la libération d'ions phosphate libres. Ces ATPases sont également impliqués dans l'importation et l'exportation de divers

métabolites pour différentes fonctions cellulaires et jouent un rôle important pour surmonter les différents types de contraintes pour maintenir le métabolisme cellulaire (Malofeeva *et al.*, 2012).

Conclusion

La fusariose vasculaire induit par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (FOC) est considéré comme la maladie la plus grave qui affecte les cultures de pois chiche (*Cicer arietinum* L). Malgré l'utilisation massive des pesticides, *Trichoderma* représente un moyen biologique très efficace pour contrôler cette maladie, c'est un champignon poussant en milieu naturel, que l'on trouve communément dans les écosystèmes à racines. Il réduit la croissance et la survie de pathogène et les infections que causent par ce dernier, via différents mécanismes, comme la compétition, l'antibiose, le mycoparasitisme, les interactions hyphales et la sécrétion d'enzymes.

L'objectif de notre travail est de tester l'effet antagonistes *in vitro* ainsi qu'*in vivo* de quelques souches de *Trichoderma* .sp., sur le FOC. Cinq espèces à savoir, *T.atroviride*, *T.virens*, *T. polysporum*, *T.european* et *T. placentula* ont été confrontées *in vitro et in vivo* avec le FOC. Les résultats de test direct ont montré un effet inhibiteur des espèces de *Trichoderma* sur le Foc, où la zone d'inhibition est variable entre 68,34% pour l'espèce *T. polysporum* et 73,98% pour *T. virens*. Les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes ont montré des modifications profondes au niveau de mycélium de ce dernier. Un enroulement massif du mycélium du *Trichoderma* sur celui du *Fusarium*, une lyse des mycéliums de pathogène, une vacuolisation et une induction du vieillissement précoce par épaissement pariétal et une formation des chlamydo-spores. Les résultats obtenus pour le test à distance montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de FOC, ces résultats nous ont permis de dévoiler l'effet inhibiteur de substances volatiles sur la croissance mycélienne du Foc dont les taux d'inhibition varient entre 21,43% pour l'espèce *T. atroviride* et 51,98% pour l'espèce *T. polysporum*.

Le traitement de semences de la variété ILC 32-79 sensible par les espèces de *Trichoderma*, a exprimé une réduction importante de la gravité de la maladie par rapport aux semences non traité, dont les taux de l'AUDPC sont variables entre 751 et 1025. Les observations régulières, ont montré que les symptômes de la maladie se manifestent par un jaunissement atypique apparu le 14^{ème} jour sur les plantules et 22 jours sur les plantules traitées par le *Trichoderma* sp. A cet effet, le traitement par l'espèce *T. virens*, a montré le taux le plus faible de l'AUDPC environ 751 et le taux le plus élevé pour *T.polysporum* avec une valeur de 1025. Ce dernier effet se traduit par une réduction très importante de la maladie estimée de 73,12% et 63,34% respectivement.

Une masse très importante en métabolites secondaires a été produite par les cinq espèces après 21 jours de la fermentation. Cependant, *T. placentula* a produit une masse importante des métabolites secondaires environ (0,9 g). Cependant, le reste des espèces ont produits une masse inférieure à 0.5g.

Les résultats des tests d'inhibition ont démontré que, le plus grand effet des extraits fongiques est observé chez l'espèce *T. atroviride* et *T. European* où les moyennes d'inhibition ont été de supérieures à 30 %. En revanche, la zone d'inhibition la plus faible a été notée chez *T. placentula*. En général, les différentes concentrations (5000, 1000 et 500 ppm) de l'extrait de métabolite secondaire révèlent que l'activité inhibitrice croit au fur et à mesure que la concentration augmente. A cet effet, La dose D₁ constaté la plus efficace et la dose D₃ la dose faiblement efficace.

Les résultats obtenus exprimant l'activité antifongique *in vivo* des métabolites secondaires de cinq espèces. Par ailleurs, *T. polysporum* est le plus efficace contre le FOC, dont la valeur moyenne de l'AUDPC calculée est 593. Ce traitement a diminué l'intensité de symptômes ainsi que la gravité de la maladie, comparativement au témoin non traité. Cependant, la valeur de l'AUDPC elles sont de 720,5 pour le traitement du même cultivar par les métabolites secondaires de l'espèce de *T. placentula*, 940,5 pour *T. virens*, 1146,5 pour *T. atroviride* et finalement l'efficacité le plus faible est constatée pour *T. european* avec une valeur d'AUDPC environ 1252,5.

En résumé, les résultats de cette modeste recherche nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel antagoniste de *Trichoderma* à l'égard de *Fusarium* testée. En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial de fixer les points suivants comme perspectives:

- L'identification des métabolites bioactifs des *Trichoderma sp.*, isolées, par HPLC.
- Et L'élongation des tests des *Trichoderma sp.*, isolées sur une gamme plus large des *Fusarium* pathogènes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adams P.M., Hanson J.R., 1972:** Sesquite rpenoid metabolites of *Trichoderma polysporum* and *T. sporulosum*. *Phytochemistry***11**, 423.
- Adams R.Z., 2002:** Indoor Environment Connections Featured Public Library Closes Down for Mold Investigation www.ieconnections.com/archive/jan_01/jan-01.html.
- Akrami M., Golzary H., Ahmadzadeh M., 2012:** Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology***10 (14)**: 2653-2658.
- Almassi F., Ghisalberti E.L., Narbey M.J., 1991:** New antibiotics from strains of *T. harzianum*. *J Nat Product* **54**, 396-402.
- Amalina A.L., Nurafifah M.N., Tony H., Meor M.F., Zainab M.L., Mohamad A.F., 2015:** Mechanism of triphenylmethane Cresol Red degradation by *Trichoderma harzianum* M06. *Bioprocess Biosyst Eng***38(11)**, 2167–2175.
- Askary H., Benhamou N., Brodeur J., 1997:** Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology***87**, 359-368.
- Ayoubi, S., Mokhtari Karchegani, P., Mosaddeghi, M. R. and Honarjoo, N. 2012 :** Soil Aggregation and Organic Carbon as Affected by Topography and Land Use Change in Western Iran. *Soil Till. Res.*, **121**: 18-26.

B

- Badj B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2005 :** Activité antifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de mycologie médicale* **15**(2005):211-219.
- Bae S.J., Mohanta T.K., Chung J.Y., Ryu M., Park G., Shim S., Hong S.B., Seo H., Bae D.W., Bae I., Kim J.J., Bae H., 2016:** *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control***92**, 128–138.
- Bahous M., Ouazzani-Touhami A., Douira A., 2008 :** Survie de quelques pathogènes fongiques sur les feuilles de riz conservées au laboratoire. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie***30**, 13-18.
- Baker S.E., Perrone G., Richardson N.M., Gallo A., Kubicek C.P., 2012:** Phylogenomic analysis of polyketide synthase-encoding genes in *Trichoderma*. *Microbiology* (Reading, England) **158**, 147-154.
- Bansal R., Mukherjee, P., 2016a:** Identification of novel gene clusters for secondary metabolism in *Trichoderma* genomes. *Microbiology***85 (2)**, 185-190.
- Barbosa M.A.G., Rehn K.G., Menezes M., Mariano R.L.R., 2001:** Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* **32**, 98-104.
- Barik B.P., Tayung K., Jagadev P.N., Dutta S.K., 2010:** Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences***2**, 8-16.
- Belabid L., Baum M., Fortes Z., Bouznad Z., Eujayl I., 2004:** Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *Afr. J. Biotechnol***3**, 25-31.

- Bélanger R.R., Labbé C., 1994:** Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist., *the American phytopathological society, plant disease***78**, 4.
- Benhamou N., Chet L., 1996:** Parasitism of sclerotia of *Scolorotium rolfsii* by *Trichoderma harzi*man: Ultra structural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathologie***86(4)**, 405-416.
- Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C., 2004 :** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol***7**, 249-260.
- Benouzza S., 2012.** Inventaire de la mycoflore de la rhizosphère de l'olivier et étude de ses potentialités antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae* Kleb: agent de la verticilliose de l'olivier. *Mémoire de MAGISTER en Biotechnologie. Université d'Oran Es-Senia* .Algérie. 150.
- Bisby G.R., 1939:** *Trichoderma viride* pers. Ex fries, and notes on *Hypocrea*. *Transactions of the British Mycological Society***23**, 149-168.
- Bissett J., 1991:** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Pachybasium. *Can. J.Bot.***69**, 2373-2417.
- Bissett J., 2004:** Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html.
- Blumenthal C.Z., 2004:** Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol Pharmacol***39(2)**, 214-28.
- Boiron P., 1996:** Organisation et biologie des champignons. *Nathan. Paris*.
- Bouregghda ,H. 2009 :** Recherche de l'effet antagoniste de *Trichoderma spp.* à l'égard de *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* (Padwick) Matuo et K. Sato (FOC), agent du flétrissement du pois chiche, *thèse de doctorat , Institut National Agronomique –El Harrach*. Algérie .p143.
- Bouregghda H., Bouznad Z., Deckock C., 2008:** Cultural and molecular characterizations of some isolates of *Trichoderma spp.* *Arab J. Pl. Prot***26**, 75-80.
- Brewer D., Mason F.G., Taylor A., 1987:** The production of alamethicins by *Trichoderma spp.* *Can J Microbiol***33**, 619–625.
- Brian P.W., MCGowan J.G., 1945:** Viridin: a Highly Fungistatic Substance Produced by *Trichoderma viride*. *Nature***156**, 144-145.

C

- Castro A.M., Pedro K.C., Cruz J.C., Ferreira M.C., Leite S.G., Pereira N., 2010:** *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Appl. Biochem. Biotechnol***162**, 2111–2122.
- Chang Y.C., Baker R., Kleifeld O., Chet I., 1986:** Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum* . *Plant Disease***70**, 145 - 148.
- Chet I., 1987:** *Trichoderma* application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soil- borne plant pathogenic fungi. Innovative approaches to plant disease control. *Wiley & Sons Inc., New York, NY, États Unis*, 137-160.
- Chet I., 1990:** Mycoparasitism, recognition, physiology and ecology. In Baker (R.), Dunn (P.) (Eds), New direction in Biological Control - Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases. *New York: R. Alan, Liss Inc*, 725-733.
- Chet I., Inbar J., Hadar I., 1997:** Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Soderstrom B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin*. 165-184.

Comporta P., 1985: Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma spp.* vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomie*5(7) : 613-620.

Cook R.J., Baker K.F., 1983: The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society, St. Paul, MN.*, 539.

D

Daryaei I., Randtke A. E., Pagel M.D., 2016 : A Biomarker-Responsive T_{2ex} MRI Contrast Agent. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 77 (4), 1665-1670. 2016 Apr 19

De Castro A.M., Ferreira M.C., Da Cruz J.C., Pedro K.C.N.R., Carvalho D.F., Leite S.G.F., Pereira JrN., 2010: High- yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res* 1(1), 1–8.

De Oliveira V.L., Bellei M.M., Borges A.C., 1984 : Control of white rot of garlic by antagonistic fungi under controlled environmental conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 30, 884–88

Dennis C., Webster J., 1971 a: Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc* 57, 41 – 48.

Dennis C., Webster J., 1971b: Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non - volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc* 57, 25– 39.

Dennis C., Webster J., 1971c: Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc* 57, 363-369.

Dickinson J.M., Hanson J.R., Hitchcock P.B., 1989: Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. *J Chem Soc Perkin Trans* 1, 1885–7.

Druzhinina I., Kopchinskiy A., Kubicek C., 2006: The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47(2), 55 – 64.

Druzhinina I.S., Seidl -Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Microbiol. Rev* 16, 749–759.

Dubey S.C., Tripathi A., Dureja P., Grover A., 2011: Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. *Agricultural Sciences* 81(5), 455–61.

Dubey S.C., Tripathi A., Singh B., 2013: Integrated management of Fusarium wilt by combined application of soil and seed dressing formulations of *Trichoderma* species to increase grain yield of chickpea. *Int. J. Pest Manage.* 59, 47-54.

Dunlop R.W., Simon A., Sivasithamparam K., 1989: An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *J. Nat. Prod.* 52, 67–74.

E

Elad Y., 1993: Mycoparasitism. In Singh (U.S.), Kohmoto (K.), Singh (R.P.) (Eds.), *Pathogenesis and host specificity in plant diseases*. Pergamon Publishers 2, 289-307.

Elad Y., Chet, I and Henis H., 1982: Degradation of plant pathogenic fungi by *Tichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol* 28, 719-726.

El-Katatny M.H., Gudelj M., Robra K.H., Elnaghy M.A., Gübitz G.M., 2001: Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii* Appl. *Microbiol. Biotechnol* 56 (1), 137–143.

Evans B.S., Robinson S.J., Kellecher N.L., 2011: Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis *in vitro* and *in vivo*. *Fungal Genet. Bio.* **48**, 49-61.

Evidente A., Cabras A., Maddau L., 2003: Viridepyronone, a new antifungal 6-substituted 2H-pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food. Chem.***51**, 6957–60.

Ezzi, M.I. and Lynch, J.M., 2002: Cyanide catabolising enzymes in *Trichoderma spp.* *Enzyme an microbial technology* **31**, 1042-1047.

F

Frisvad J.C., Samson R.A., 1991: Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. *Handbook of Applied Mycology* **3**, 31-68.

G

Gava C.A.T., Pinto J. M., 2016: Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma spp.* and liquid compost. *Biological Control***97**, 13–20

Gal-hemed I., Atanasova L., Komon-zelazowska M., Druzhinin I.S., Viterbo, A., Yarden O., 2011: Marine isolates of *Trichoderma spp.* as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl. Environ. Microbiol.***77**, 5100–5109.

Gerhardson B., 2002: Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol***20**, 338-343.

Ghisalberti E.L., Rowland C.Y., 1993: Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.* **56(10)**, 1799-804

Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., 1991: Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma spp.* *Soil Biol. Biochem.***23**, 1011-1020.

Ghorri S., 2015: Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. *Thèse de Doctorat, Université frères Mentouri constantine*. Algérie. 154.

Godtfredsen W.O., Vangedal S., 1965: Trichodermin a new sesquiterpene antibiotic. *Acta Chem Scand***19(5)**, 1088-1102.

Gogoi D.K., Mazumder S., Saikia R., Bora T. C. 2008 : Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea spp.* NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. In North-East India. *Journal de mycologie medicale*, **18(2008)**:1-9.

Gutter et monbaasher., 1963 : cité dans **Mohamed-benkada M., 2006:** Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. *Th. Pharmacie. Nantes.* **9**, 10-13.

H

Hammill T.M., 1974: Septal pore structure in *Trichoderma saturnisporum*. *Amer. J. Bot.* **61**, 767-77.

Hanson L.E., Howell C.R., 2002: Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. *Mycol. Res.***106 (3)**: 321–328.

Harman G.E., Hayes C.K., Lorito M., Broadway R.M., Di Pietro A., Peterbauer C., Tronsmo A., 1993: Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* : purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology***83**, 313-318.

Harman G.E., 2000: Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease***84**, 377-393.

Harman G.E., 2011: Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol***189**, 647–649.

Harris G.H., Turner E.T., Meinz M.S., Nallin-Omstead M., Helms G.L., Bills G.F., 1993: Isolation and structure elucidation of viridofungins A, B and C. *Tetrahedron Letters***34(33)**, 5235–5238.

Haware M.P., Nene Y.L., Mathur S.B., 1986: Seed - borne diseases of chickpea. Technical Bulletin, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries.

Hazalin N.A., Ramasamy K., Lim S.M., Wahab I.A., Cole A.L., Abdul Majeed A.B., 2009: Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine***9**, 46.

Heguera G., Beauge L., 1997: Phosphoryl group exchange between ATP and ADP catalyzed. *Plant Physiol***114**, 1397-1403.

Hibar K., Daami-Remadi M., Khiaaareddine H., El Mahjoub M., 2005: Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc Environ***9(3)**, 163-171.

Hill R.A., Cutler H.G., Parker S.R., 1995: *Trichoderma* and metabolites as control agents for microbial plant diseases. *PCT Int Appl* **9520879**.

Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A.,(1996): Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.***26**, 697–705

Howell C.R., 2003: Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis***87**, 4-10.

Howell C.R., Stipanovic R.D., 1984: Phytotoxicity to crop plants and herbicide effects on weeds of viridiol produced by *Gliocladium virens*. *Phytopathology***74**, 1346–1349.

I

Irum M., 2007: Comparison of phytochemical and chemical control *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Mycopathology* **5(2)**, 107–110.

J

Johanne Caron., 2002 : Phytopathologiste Horti-Protection inc .Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.

Johanning E., Gareis M., Nielsen K., Dietrich R., Martlbauer E., 2002: Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis. <http://www.ibt.dtu.dk/mycology/staff/kfn/papers/Airborne-mycotoxin2002.pdf>

Jones R.W., Hancock J.G., 1987: Conversion of viridin to viridiol by viridin producing fungi. *Can J Microbiol***33**, 963–6.

K

Keller N.P., Turner G., Bennett J.W., 2005: Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol***3**, 937-947.

Keswani C., Mishra S., Sarma B., Singh S., Singh H., 2014: Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol***98**, 533-544.

Kezler A., Forgacs E., Kotai L., Vizcaino J. A., Monte E., Garcia-Acha I., 2000: Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography Sciences***38**, 421-424.

Khan I. A., Alam S. S., Jabbar A., 2001: Standardization of medium for the production of maximum phytotoxic activity by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **4**: 1374-1376.

Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R., Takabayashi J., 2007: Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *J Gen Plant Pathol***4**, 35–37.

Korpi A., Jarnberg J., Pasanen A.L., 2009: Microbial volatile organic compound. *Crit. Rev. Toxicol.***39**, 139-193.

Kubicek C.P., Komon-zelazowska M., Druzhinina I.S., 2008: Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from **Kullnig-Gradinger C., March R. L., Lorito M., Kubicek C.P., 2000** : Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech 42 gene expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology***66**, 2232-2234.

L

Landa B.B., Hervás A., Bethiol W., Jiménez - Diaz R.M., 1997: Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica***25(4)**, 305–318.

Landa B.B., Navas-Cortés J. A., Jiménez-Diaz R.M., 2004: Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology***94**, 946-960.

Landreau A., 2001: Métabolites d'une souche de *Trichoderma Koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, Biologie et risques pour les coquillages en culture. *Th. Pharmacie. Nantes*. 201.

Lida A., Sanekata M., Fujita T., 1994: Fungal metabolites. XVI. Structures of new peptaibols, trichokindins I-VII, from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1070–1075.

Lopez-bucioa J., Pelagio-flores R., Herrera-estrellab A., 2015: *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* **196**, 109–123.

M

Maatougui, M. E. H., Bouznad, Z. and Labdi, M., 1996: Chickpea in Algéria. In N.P., Saxena, M.C., Johansen, C., Virmani, S. M., and Harris, H.(eds). A chapter from adaptation of chickpea in the west Asia and North Africa region pp 89-99

Mayer, M. S., Tullu, A., Simon, C. J., Kumar, J., Kaiser, W. J., Kraft, J. M. and Muehlbauer, F. J., 1997: Development of a DNA marker for *Fusarium* wilt resistance in chickpea. *Crop Sciences* **37**: 1625-1629.

Malofeeva E., Domanitskaya N., Gudima M., Hopper-Borge E.A., 2012: Modulation of the ATPase and transport activities of broad-acting multidrug resistance factor ABCC10 (MRP7) *Cancer Res***72 (24)**, 6457–6467.

Mohamed-benkada M., 2006: Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. *Th. Pharmacie. Nantes*. **9**, 10-13.

Moussaoui M., 2010: Développement et extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs. *Mémoire de Master, Univ. Mentouri, Constantine*, 64p.

Mukherjee M., Horwitz B.A., Sherkhane P.D., Hadar R., Mukherjee P.K., 2006: A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma reesei*: evidence from analysis of genes underexpressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic production. *Current Genetics***50**,193–202.

N

Navas-Cortés J.A, Hau B., Jiménez-Díaz R.M., 2000a: Yield loss in chickpeas in relation to development of *Fusarium* wilt epidemics. *Phytopathology***90**, 1269-1278.

Navas-Cortés, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B. and Jiménez-Díaz, R. M., 2000b: Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivar. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 135-146.

Navazio L., Baldan B., Moscatiello R., 2012: Plant Cell Suspension Cultures. *Plant Mineral Nutrients***953**, 77-93.

Nene and Haware .,1980. Screening Chickpea for Resistance to Wilt. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), ICRISAT Patancheru P.O., Andhra Pradesh 502 324, India. *Plant Disease***64**, 379-380.

Nene Y.L., 1980: Diseases of chickpea. Proceeding international work shop on chickpea improvement. ICRISAT, 28 Feb-2 Mai 1979 Hyderabad, A. P., India. 171-178

O

Oh S.U., Lee S.J., Kim J.H., Yoo I.D., 2000: Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B, and C from *Trichoderma atroviride*. *Tetrahedron Letters***41**, 61- 64.

Ojaghian M.R., 2011: Potential of *Trichoderma spp.* and *Talaromyces flavus* for Biological Control of Potato Stem Rot Caused by *S. sclerotiorum*. *Phytoparasitica***39**, 185-193.

P

Papavizas G.C., 1985: *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol* **23**, 23-54.

Persoon C.H., 1794: Disposita methodica fungorum. *Römer's Neues Mag. Bot***1**, 81-128.

Pivkin M.V., 2000: Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.* **198(1)**, 101-109.

Poole P.R., Ward B.G., Whitaker G., 1998: The effects of topical treatments with 6-pentyl-2-pyrone and structural analogs on stem end post-harvest rots in kiwi fruit due to *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem***77**, 81-8.

Prasun K.M., Benjamin A.H., Alfredo H.E., Monika S., Charles M.K., 2013: *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Phytopathology***51**, 105-129.

Q

Qin J.C., Zhang Y.M., Gao J.M., Bai M.S., Yang S.X., Laatsch H., Zhang A.L. 2009 : Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum* endophytic fungus isolates from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* **19** (2009):1572-1574

R

- Reculeau-arnoud X., 2003:** Production et étude de toxicité des Peptaïbols d'une souche marine de *Trichoderma koningii*. Thèse de docteur en pharmacie. université de Nantes faculté de pharmacie.p 80.
- Reino J.L., Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I.G., 2008:** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*7, 89–123.
- Reithner B., Schuhmacher R., Stoppacher N., Pucher M., Brunner K., Zeilinger S., 2007:** Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genet Biol.*44, 1123–1133.
- Rifai M.A., 1969:** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia.Papers*116, 1-56.
- Roebroek, E. J. A. & Mes, J. J. 1998.** Physiological races and vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Neth. J. Pl. Path.* 98: 57-64.
- Roquebert M.F., 1996:** Interactions antagonistes des *Trichoderma* dans les écosystèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. *Compte-rendu des 4^{ième} rencontres en toxicologie*, 13-15.

S

- Samuels G.J., 1996:** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100:923-935
- Samuels G.J., Chaverri P., Farr D.F., Mc Cray E.B., 2004:** *Trichoderma* Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 31, 2004, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. _8.
- Samuels G.J., Petrini O., and Manguin S., 1994:** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*86, 421- 435.
- Sarrocco S., Mikkelsen L., Vergara M., Jensen D.F., Lübeck M., Vannacci G., 2006:** Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *Mycological Research*110, 179-187.
- Scarselletti R., Faull J.L., 1994:** *In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Mycological Research*98, 1207-1209.
- Schmoll M., Dattenbock C., Carreras-Villasenor N., Mendoza-Mendoza A., Tisch D., Aleman M.I., Baker S.E., Brown C., Cervantes-Badillo M.G., Cetz Chel J., Cristobal-Mondroangon, G.R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E.U., Frischmann, A., Gallardo-Nagrete Jde J., Garcia-Esquivel M., Gomez-Rodriguez E.Y., Greenwood D.R., Hernandez-Onate M., Kruszewska J.S., Lawry R., Mora-Montes H.M., Munoz-Centeno T., Nieto-Jacob M.F., Nogueira Lopez G., Olmedo-Monfil V., Osorio-Concepcion M., Pilsyk S., Pomraning K.R., Rodriguez-Iglisias A., Rosales-Saavedra M.T., Sanchez-Arreguin J.A., Seidl-Seiboth V., Stewart A., Uresti-Rivera E.E., Wang C.L., Wang T.F., Zeilinger S., Casas-Flores S., Herrera-Estrella A., 2016:** The Genomes of three uneven sibling : footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* Species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*80, 205-327.
- Schubert M., Fink S., Schwarze F.W.M.R., 2008:** Evaluation of *Trichoderma spp.* as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control*45, 111–123.
- Shahzad M., Qaiser J., Kalsoom B., Sikandar K., Tasveer Z., Tariq A.K., Rashid A.K., Abdul J., Muhammad A., 2013:** International Journal of Agriculture and Crop Sciences. IJACS/2013/6-18/1246-1252 ISSN 2227-670X c2013.
- Shalini S., Kotasthane A.S., 2007:** Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma spp.* *EJEAFChe*6(8), 2272-2281.

Sharma P.C., Winter P., Bünger T., Hütte B., Kahl G., 1994: Expanding the repertoire of molecular markers for resistance breeding in chickpea. *ICARDA, Aleppo, Syria*.175-198.

Siddiquee S., 2014: Chapter 11-Recent Advancements on the Role and Analysis of Volatile Compounds (VOCs) from *Trichoderma*. *Elsevier, Amsterdam*, 139-175.

Singh A., Srivastava S., Singh H.B., 2007: Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology***98**, 470-473.

Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R., Schumacher R., 2010: Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviridae* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods* **81**, 187–193.

Strieker M., Tanovic A., Marahiel M.A., 2010: Non ribosomal perptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.***20**, 234-240.

Subhani M.N., Shahbaz T. S., Liaqat A., Safdar H., Javaid I., Nisar H., 2013: Management of Chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporium f. sp. ciceris* through antagonistic microorganisms. *Canadian Journal of Plant Protection***1**, 1-6.

T

Tachikawa E., Takahashi S., Furumashi K., Kashimoto T., Iida A., Nagaoka Y., Fujita T., Takaishi Y., 1991: Trichosporin B-III, an alpha-aminoisobutyric acid containing peptide, causes Ca²⁺ dependant catecholamine secretion from adrenal medullary chromaffin cells. *Mol. Pharmacol***40**, 790-797.

Trapero-Casas A., 1983: Wilt and root rot of chickpea in the Guadelquivir valley: importance, distribution, etiology, epidemiology and control (Original in spanish). *Ph. D.thesis, University of Cordoba*: 295.

Trapero-Casas A., Jiménez-Díaz R.M., 1985: Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology***75**, 1146- 1151.

Trivedi S., Trivedi N., Chaudhary R.G., 2013: Efficacy of *Trichoderma* strains against *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* the incitant of wilt disease in chickpea. *Journal of Mycology and Plant Pathology* **43(1)**, 102-106.

Tronsmo A., Dennis C., 1978: Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Trans Brit Mycol Soc.***71(3)**, 469–474.

V

Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Sahai V., Prévost D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., 2007: Benchscale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme and Microbial Technology***41(6)**, 764- 771.

Villajuan-Abgona R., Kagayama K., Hyakumachi M., 1996 : Biocontrol of *Rhizoctonia* damping -off of cucumber by non pathogenic binucleate *Rhizoctonia*. *Eur. J. Plant Pathol*, **102**: 227-235.

Vinale F., Marra R., Scala F., 2006: Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl Microbiol***43**, 143–8.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., 2012: *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun***7**, 1545–50

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Woo S.L., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Ruocco M., Lanzuise S., Manganiello G., Lorito M., 2014: *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal***8**, 127-139

Vining, I.c., 1990: Fonctions of secondary metabolites, *Annu.Rev.Microbiol* **44**, 395-427.

Vizcaino J.A., Sanz L., Cardoza R.E., Monte E., Gutierrez S., 2005: Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microb. Lett***244**, 139–148.

Vuillemin., 1887 : Études biologiques sur les Champignons. *Bull. Soc. Sci. Nancy. Ser.2*, 113–122.

W

Webster J., 1971b: Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non - volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc***57**, 25– 39.

Weidling R., 1934: Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lingorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology***24**, 1153- 1179.

Whipps J.M., 2001: Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**: 487-511.

Woo S.L., Ruocco M., Vinale F., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Lanzuise S., Manganiello G., Lorito M., 2014: *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The Open Mycology Journal***8**, 71-126.

X

Xiaoling C., Xiaoli L., Shining Z., Junping G., Shuiping W., Xiaoming L., Zhigang S., Yongcheng L., 2010: Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment***2**, 017-024.

Y

Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y., Chet I., 2001: Effects of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil***235**, 235–242.

Yedidia I., Benhamou N., Chet I., 1999: Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1061–1070.

Z

Zeilinger S., Garcia-Estrada C., Martin J.-F., 2015: Fungal secondary metabolites in the « OMICS » era. *Springer New York***2**, 1-12.

Zhu Z.S., Fu-Cheng L., Chu-Long Z., Kubicek C.P. , Wei L.W., Bai G.X., Wang J.Y., 2011: Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. *Applied Microbial and Cell Physiology***93**, 1231–1239.

ANNEXE 1

- **Milieu PDA** (Stérilisation à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C / pH : 7,0-7,2)

Composé	Quantité
Pomme de terre	200 g
Glucose	20g
Agar	20g
H ₂ O q.s.p.	1000ml

- **Milieu liquide pour la production du mycélium** (Stérilisation à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C / pH : 7,0-7,2)

Composé	Quantité
Pomme de terre	200 g
Glucose	20g
H ₂ O q.s.p.	1000ml

- **Résultats d'Analyse de la variance d'ANOVA, confrontation direct et à distance entre les cinq espèces de *Trichoderma* et le FOC**

- **Confrontation directe**

	ddl	MS	SS	F	P
Interc	1	290003,6	290003,6	11473,56	0,000000
Espèces	4	175,6	43,9	1,74	0,160873
Temps	3	339,3	113,1	4,47	0,008425
Esp*temp	12	126,3	10,5	0,42	0,948056
Er	40	1011,0	25,3		
Total	59	1652,3			

- **Confrontation à distance :**

	ddl	MS	SS	F	P
Interc	1	101240,5	101240,5	1075,452	0,000000
Espèces	4	3246,8	811,7	8,622	0,000041
Temps	3	6028,1	2009,4	21,345	0,000000
Esp*temp	12	903,7	75,3	0,800	0,648191
Er	40	3765,5	94,1		
Total	59	13944,1			

ANNEXE 2

- **Résultats des analyses statistiques d'ANOVA de valeurs d'AUDPC** (l'effet protectif des espèces *Trichoderma* chez le cultivar (ILC 32-79) inoculé par l'isolat FOC *in vivo*)

	Ddl	MS	SS	F	P
Inerc	1	11557993	11557993	448,5553	0,000000
Espèces	4	178150	44537	1,7285	0,219893
Temps	10	257672	25767		
Err	14	435821			
Total	1	11557993	11557993	448,5553	0,000000

- **Résultats des analyses statistiques d'ANOVA de l'effet des métabolites secondaires de cinq espèces du *Trichoderma* sur le FOC**

	Ddl	MS	SS	F	P
Inerc	1	217934,2	217934,2	4008,098	0,000000
Espèces	4	7293,3	1823,3	33,533	0,000000
Dose	2	48558,5	24279,3	446,528	0,000000
Temps	3	10185,4	3395,1	62,441	0,000000
Sp*do	8	1033,7	129,2	2,376	0,020629
Sp*ti	12	1164,5	97,0	1,785	0,058049
d*t	6	237,4	39,6	0,728	0,628246
Sp*d*t	24	2427,8	101,2	1,860	0,015478
Err	120	6524,8	54,4		
Total	179	77425,5			

Résumé

La fusariose vasculaire induit par le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) est considéré comme la maladie la plus grave qui affecte les cultures du pois chiche (*Cicer arietinum* L). Dans le but de chercher des méthodes de luttés alternatives aux pesticides chimiques, cinq espèces indigènes de *Trichoderma* (*T.atroviride*, *T.virens*, *T. polysporum*, *T.european* et *T. placentula*) ont été testées vis-à-vis le FOC *in vitro* et *in vivo*. Les résultats de l'antagonisme ont montré l'efficacité de toutes les espèces de *Trichoderma* contre le FOC, dont les taux d'inhibition varient entre 68,34% et 73,98% pour la confrontation directe, et entre 21,43% et 51,98% pour le test à distance. L'enrobage de semences de la variété ILC 32-79 sensible par les espèces de *Trichoderma*, a exprimé le pourcentage le plus élevé de réduction de la gravité de la maladie marqué par *T.virens* environ de 73,12% dont les taux de l'intensité de la maladie (AUDPC) sont variables entre 751 et 1025. Les différentes concentrations (5000, 1000, 500 ppm) de l'extrait de métabolite secondaire de cinq espèces *Trichoderma* révèlent que l'activité inhibitrice croit au fur et à mesure que la concentration augmente, où le plus grand effet est observé chez l'espèce *T. atroviride* dont, la zone d'inhibition constatée est de 57,53% avec la concentration C₁. Cependant, l'application *in vivo* des métabolites secondaires a montré leurs efficacité vis-à-vis le FOC, l'espèce *T. polysporum* est considéré comme le plus efficace, dont la valeur de l'intensité de la maladie (AUDPC) calculée est 593 pour la concentration 5000 ppm exprime une réduction de 79,29% de la gravité de maladie.

Mots clés : La fusariose vasculaire, le pois chiche, Lutte biologique, *Trichoderma .sp.*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC), Métabolites secondaires, AUDPC.

المخلص

يعتبر مرض الذبول الوعائي المتسبب بفعل الفطر الممرض الفوزاريومي من الأمراض الأكثر خطورة التي تؤثر على محاصيل الحمص. في إطار البحث عن طرق المكافحة البديلة للمبيدات الكيميائية، تمت دراسة المفعول البيولوجي لخمسة أنواع محلية من فطر *Trichoderma sp* أظهرت نتائج التضاد فعالية كافة أنواع *Trichoderma* ضد FOC، بحيث تتفاوت معدلات التثبيط المباشر بين 68,34% و 73,98% وبين 21,43% و 51,98% بالنسبة للتثبيط غير المباشر. أعرب غمر بذور الحمص (النوعية: ILC 32-79) الحساسة للمرض في فطريات *Trichoderma* عن انخفاض في شدة المرض، بحيث تميزت *T. virens* بأعلى نسبة والتي تقدر ب 73,12%، في حين تراوحت نسبة شدة المرض (AUDPC) بين 751 و 1025. التراكيز المختلفة (5000، 1000، 500 جزء في المليون) من المستخلصات الأيضية الثانوية لخمسة أنواع الترايكونديريما يدل على أن زيادة نشاط التثبيط يتناسب طردياً مع زيادة التركيز، حيث أظهر الفطر *T. atroviride* تأثيراً كبيراً على الفوزاريوم بحيث أنه ثبط نموه بنسبة 57,53% حسب التركيز الأول (5000 جزء في المليون). في حين، أثبت تطبيق المستخلصات الأيضية الثانوية في الطبيعة فعاليته ضد الفطر الفوزاريومي، بحيث وجد بأن الفطر *T. polysporum* الأكثر فعالية ويعتبر *polysporum*. T. الأنواع الأكثر فعالية، ويتم احتساب قيمة شدة المرض (AUDPC) بنسبة 593 (بالنسبة للتركيز 5000 جزء في المليون) والذي أعرب عن انخفاض بنسبة 79,29%.

الكلمات المفتاحية : الذبول الوعائي، الحمص، المكافحة البيولوجية، *Trichoderma sp*. *Fusarium oxysporum* f. *Ciceris* (FOC)، *sp*، المستخلصات الأيضية الثانوية، AUDPC.

Abstract

Fusarium wilt induced by the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* (FOC) is considered the most serious disease affecting chickpea (*Cicer arietinum* L). In order to find alternative methods of fighting chemical pesticides, five native species of *Trichoderma* (*T.atroviride*, *T.virens*, *T. polysporum*, *T.european* and *T. placentula*) were tested against the FOC *in vitro* and *in vivo*. The results of the antagonism showed the efficacy of all species of *Trichoderma* against FOC, with inhibition rates varying between 68.34% and 73.98% for direct confrontation, and between 21.43% and 51.98% for remote testing. Seed coating of the variety ILC 32-79 sensitive by *Trichoderma* species, expressed the highest percentage of severity reduction of *T.virens* labeled disease about 73.12% whose levels of I' AUDPC are variable between 751 and 1025. The different concentrations (5000, 1000, 500 ppm) of the secondary metabolite extract of five *Trichoderma* species show that the inhibitory activity increases as the concentration increases, where the greatest effect is observed in the species *T. atroviride* whose observed zone of inhibition is 57.53% with the concentration C₁. However, the *in vivo* application of secondary metabolites has demonstrated their efficacy against FOC, where the *T. polysporum* species is found to be most effective with a calculated mean AUDPC value of 593 for the 5000 ppm concentration expresses a 79.29% reduction in disease severity.

Key words: Fusarium wilt, chickpea, Biological control, *Trichoderma .sp.*, *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Ciceris* (FOC), Secondary metabolites, AUDPC.