

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie



Mémoire présenté

En vue de l'obtention du diplôme de Master Biotechnologie des mycètes
Option: biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de
substance fongique

Thème

**Evaluation de l'effet de *Trichoderma sp* vis-à-vis de quelques pathogènes
des Lentilles (*Lens culinaris*)**



Présenté par :

KABOUCHE Mouatez billah & HAMROUCHE Abdeldjallil

Devant le jury :

Encadreur : Mr. DEHIMAT L.

Pr. Université Constantine 1

Président : Mr. KACEM CHAUOCHE N.

Pr. Université Constantine 1

Examineur : M^{elle} LAHLAH.

MA. Université Constantine 1

Tutrice : M^{elle} ALMI HIBA

MA. Université Constantine 1

Année universitaire

2013-2014



Remerciement

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à Remercier en premier lieu le bon dieu le tous puissant de nous avoir donnez le courage pour accomplir ce petit projet.

Nous remercions par la suite très vivement Mr DEHIMAT L. doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie et notre promoteur pour sa confiance, son soutien, sa gentillesse et sa patience pendant la correction de cette thèse.

Nous remercions également Mr KACEM CHAUCHE N. et Mme MIHOUBI pour leurs soutiens et orientations pendant toutes les années d'études.

Un grand merci également a M^{elle} ALMI HIBA notre Co-encadreur au niveau du laboratoire nous tenons à exprimer une grande considération et nous espérons pour elle un grand succès pour son stage ainsi que pour M^{elle} MILLETASMA.

Nous remercions également M^{elle} BENSERADJ Ouafa, M^{me} GHORRI SANA et M^{me} HAFIRASSO Anissa pour orientation sans oublier M^{elle} BOUKERMA Amina et Mme AHLAM et toutes l'équipe du laboratoire de Mycologie de biotechnologie et activité microbienne pour leur aide.

Nous remercions s'adressent aussi aux personnages responsables du magasin de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour leurs gentilleses et aides.

Nous remercions aussi tous les enseignants de la faculté en générale et ceux de biotechnologies des mycètes en particuliers.

Nous remercions également la société d'AXIUM (Ain Smara) et son directeur

Mr BENLBEDJAOUI pour leur coopération via M^{elle} ALMI pour la fourniture des variétés de lentilles et la société d'ITGC (Elkhroub) pour la documentation.

Enfin un grand Remerciement aux membres du jury,

Le Professeur KACEM CHAUCHE.N et M^{elle} LAHLAH d'avoir accepté et d'évaluer notre travail.

Merci a tous

Dédicace

Je dédie ce travail modeste à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU me les garde tous les deux.

A mes chers frères (Borhan et Amir),

A tous la famille paternelle et maternelle,

A tous mes amis (Alla, Yasser, Ahmed, Adel.....),

A tous mes collègues de promotion (Abd aljallil, Saber,.....).

Mouatez billah

Dédicace

*A mon estimable et cher père l'idéal de l'engagement de la responsabilité
et de la fidélité*

Merci pour votre patience, votre encouragement votre sacrifice pour moi

*A mon estimable et cher Mamou l'exemplaire de l'affection, et de la
compassion, et de l'amour éternel merci pour votre veille a moi et je n'ai*

Jamais oublié, votre invocation à la prière pour ma réussite

*Mon père ma mère je m'excuse profondément mille fois de t'avoir
dérangé*

Je souhaite pour vous le bonheur dans la vie et le paradis dans l'extrémité a

*A ma grand- mère Zouina, je souhaite la bonne santé, elle a 83
puisse telle vive plus cent ans*

A mes chers frères et à mes sœurs, (Melek, Imen, Inès,).

Je dédicace ce travail a mes parents ma famille et mes amis.

Abd el djalil

Sommaire

- Liste des figures
- Liste des tableaux
- Liste des abréviations

1-Introduction.....	1
2- Revue bibliographique.....	2
2-1- Présentation de la plante modèle: <i>Lens culinaris</i>	2
2-1-1- Description.....	2
2-1-2- Donnée génétique.....	2
2-1-3- Position systématique.....	3
2-1-4-Variétés.....	3
2-1-5- Cycle biologique.....	4
2-1-6- Culture et Production.....	5
2-2- Phytopathologies des lentilles	6
2-3- Lutte biologique.....	9
2- 4- <i>Trichoderma</i>	10
2-4-1-Généralités.....	10
2- 4-2-Systématique.....	10
2- 4-3- Ecologie.....	11
2-4-4-Morphologie.....	12
2-4-5- Cycle biologique	12
2- 4-6- Les métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i>	14
a- Production d'enzymes.....	14
b - Production des substances bioactives.....	14
c - La biosynthèse des acides aminés.....	14
2-4-8-Modes d'actions des <i>Trichoderma</i>	15
a- L'antibiose.....	15
b- La compétition.....	15
c- Le parasitisme.....	15

2-4-8- <i>Trichoderma</i> comme fongicide commercialisé.....	16
3-Matériel et méthodes.....	17
3-1- Présentation des zones d'étude.....	17
3-2- Prélèvement des échantillons.....	18
3 -3- Etude mycologiques de plantes infectées.....	19
3-3-1- Préparation des milieux des cultures.....	19
3-3-2- Méthode d'isolement.....	19
3-3-3- Purification des souches	20
3-3-4-Identification des isolats.....	20
a- Identification macroscopique	20
b- Identification microscopique.....	20
3-3-5-Conservation des Isolats.....	21
a-Préparation de milieu de conservation.....	21
b- Méthode de conservation.....	21
3-4-Test d'antagonisme <i>In vitro</i>	21
3-4-1- Confrontation direct.....	21
a-Principe.....	21
b-Calcul.....	22
3 -4-2-Confrontation à distance	22
a-Principe.....	22
b-Calcul.....	23
3-5-Test d'antagonisme <i>In vivo</i>	23
3-5- 1- Préparation du sol.....	23
3 -5-2- Culture des lentilles.....	23
3-5-3- Fermentation de <i>Trichoderma</i>	24
3-5-4- Préparation de la solution d'inoculation de <i>Trichoderma sp</i>	24
3-5-5- Préparation de la suspension sporale des agents pathogènes.....	25
3-5- 6- Inoculation de l'antagoniste et du pathogène.....	25
4-résultat et discussions	27
4-1-Isolement et identification des souches fongiques à partir des Lentilles infectées.....	27

4 -2- Test d'antagonisme <i>In Vitro</i>	36
4- 2 -1- Tests de confrontation directe.....	36
4 -2 -2- Tests de confrontation à distance.....	41
4-3- Test <i>in vivo</i>	43
5 -Conclusion	46
➤ Résumé	
➤ summary	
➤ الملخص	
➤ Annexe	
➤ Références bibliographiques	

Liste des figures

Figure 01 : Les différentes parties de lentille (Schwartez et Langham ,2012).....	2
Figure02 : Les différentes variétés des Lentilles cultivées en Algérie (ITGC ; 2011).....	4
Figure03 : Cycle biologique des légumineuses (Anonyme01,2014).....	5
Figure 04 : Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC ,2010).....	6
Figure05 : La rouille de lentille et le espèce responsable de maladie (Douici –Khalfi A ;2011).	7
Figure06 :L'antracnose de lentille (Anonyme02, 2014).....	7
Figure07 :L'ascochytose de lentille (Douici –Khalfi A ,2011).....	7
Figure 08 :La pourriture grise de lentille et agent responsable de maladie (Hawthorne W ;2012 ; Sakhr , 2009).....	8
Figure09 :la fusariose de lentille et agent pathogène responsable de maladie (Anonyme 02,2014 ; Chabasse ,2002).....	8
Figure10 :Les cinq sections systématiques de <i>Trichodermasp</i> et quelques-unes des espèces y appartenant Bissett (Bissett ;1991)	11
Figure11 : Aspect macroscopique de <i>Trichoderma sp</i> (Anonyme03,2014).....	12
Figure 12 : Aspect microscopique de <i>Trichoderma sp</i> . (Anonyme 03,2014).....	12
Figure13 :Cycle de vie <i>Trichoderma sp</i> (Anonyme04,2014)	13
Figure14 : Cartes d'Algérie représentant les zones d'échantillonnages de Constantine et Oum-El-Bouaghi. (Anonyme 5,2014 ; Anonyme 6,2014).....	18
Figure 15 : Jardin de Chaab Rssas et Champ de Ouled Hamla	19
Figure 16 : Echantillons de plantes infectés.....	20
Figure 17 : Confrontation direct de <i>Trichodermasp</i> et l'agent pathogène par contact directe sur milieu PDA.....	22
Figure 18 : Confrontation à distance entre <i>Trichoderma sp</i> et agent pathogène.....	23
Figure 19 : échantillon des graines des lentilles cultivées pour réaliser le test <i>In Planta</i>	24
Figure 20 :L'aspect macroscopique de <i>Trichoderma sp</i> Agée15 jours sur milieu PDA.....	24

Figure 21 : la Biomasse de <i>Trichoderma sp</i> en milieu MEA(A) et filtration de milieu de fermentation de <i>Trichoderma sp</i> (B).....	..25
Figure 22 : comptage de spores de <i>trichoderma sp</i> par cellule de Thoma et pulvérisation de plantes de lentilles par filtrat de <i>Tirchoderma sp</i>	25
Figure 23 : Suivie de l'inhibition de la croissance d' <i>Aspergillus sp</i> en présence de <i>Trichodermasp</i>	37
Figure 24 : Suivie de l'inhibition de la croissance d' <i>Penicillium sp</i> en présence de <i>Trichodermasp</i>	38
Figure 25 : Suivie de l'inhibition de la croissance d' <i>Fusariumsp</i> en présence de <i>Trichodermasp</i>	38
figure 26 : Suivie de l'inhibition de la croissance d' <i>Alternaria sp</i> en présence de <i>Trichodermasp</i>	38
Figure 27 : Effet de <i>Trichoderma sp</i> avec les agents pathogènes sur la croissance des plantes, après 30 jours d'inoculation.....	43
Figure 28 : pourcentage de plantes mortes dans le cas de la pulvérisation par l'agent pathogène et <i>Trichoderma sp</i> sur plante de lentille comparativement aux témoins	44

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification de lentille(Cokkizgin A et al, 2013).....	3
Tableau 02 : Classification de <i>Trichoderma</i> sp(Gary et al. ,2011).....	10
Tableau 03 : Les principales substances bioactives de <i>Trichoderma sp</i> (Benkhada , 2006).....	14
Tableau 04 : La concentration sporale de chaque agent pathogène.	26
Tableau05 : Isolats fongiques obtenus des échantillons des Lentilles infectées prélevées a Ouled Hamla et Chaab Rssas	28
Tableau06: Effet de <i>Trichoderma sp</i> sur la croissance mycélienne des souches pathogènes (confrontation directe) après 7 jours d'incubation.....	39
Tableau 07 : Effets inhibiteurs de <i>Trichoderma sp</i> sur la croissance mycélienne des agents pathogènes (confrontation à distance) après 7 jours incubation.....	42

Liste des abréviations

% : pourcentage.

°C : degré Celsius.

AA : Acides Aminés

al : Collaborateurs.

cm : Centimètre.

E.P : Eau physiologique.

g : gramme.

Gr : Grossissement.

Km : Kilomètre.

km² : Kilomètre carré.

m : Mètre.

MEA: Malt- Extract- Agar.

min : Minute.

mL : Millilitre.

N° : numéro

PDA : Potato Dextrose Agar.

pH : Potentiel d'hydrogène.

sp : Espèce.

1-Introduction

1-Introduction

Les lentilles (*Lens culinaris*) font partie d'un immense groupe de plantes : les légumineuses. historiquement ce groupe de plantes est probablement originaire d'Asie occidentale, d'où elle s'est diffusée vers le Méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe. Les graines des lentilles forment depuis l'antiquité des plats de subsistance des pauvres.

En Algérie, la culture des lentilles, s'étalent sur de grandes surfaces, mais malheureusement les rendements annuels de cette plante sont faibles et instables ceci s'explique en particulier par leur sensibilité à la contrainte abiotique comme le froid hivernal, les gelées printanières, la chaleur, la Salinité...etc. et biotique liés aux plantes parasites, insectes ravageurs et en particulier les maladies dû aux mycètes phytopathogènes.

La résolution des problèmes phytopathologiques rencontré dans la pratique agronomique, repose sur la connaissance approfondie d'une part de la plante hôte, de son environnement et des modalités de sa culture d'une part, la connaissance des agents pathogènes et de leurs conditions de développement d'autre part. Pour lutter contre ces champignons phytopathogènes la lutte biologique forme une alternative très importante.

À nos jours, plusieurs milliers de micro-organismes antagonistes ont été décrits dans ce domaine (virus, bactéries, microchampignons et protozoaires) et plus d'une centaine d'espèces sont utilisées en champs (Ignoffo, 1970 ; Ignoffo, 1973).

C'est dans ce sens, que nous avons orienté notre étude, à mettre au point un moyen biologique de lutte par le champignon *Trichoderma sp* contre les maladies fongiques des lentilles ; en évitant les effets indésirables tels que la pollution environnementale et la toxicité de l'homme, engendrée par la lutte chimique classique.

Notre travail est donc scindé en plusieurs étapes:

1. Isolement des souches fongiques pathogènes à partir des différents organes infectés de lentilles (racines, tiges et feuilles) ;
2. Purification et identification macro et microscopique des isolats obtenus ;
3. Mise en évidence des tests d'antagonismes *in Vitro* et *in vivo* en utilisant une souche de *Trichoderma sp*.

2- Revue bibliographique

2- Revue bibliographique

2-1- Présentation de la plante modèle: *Lens culinaris*

2-1-1- Description

Les Graines de lentilles sont rondes et séchées, elles proviennent d'une plante buissonnante herbacée et annuelle. On les différencie et on les nomme selon leur couleur et leur taille (Wenger ,2004).

Les lentilles sont des plantes naines, elles poussent jusqu'à une hauteur de 200 mm à 500 mm et possèdent un système racinaire restreint. Elles présentent, à maturité, une tendance à la verse due à sa tige fragile. Les plantes comportent aussi de nombreuses branches souples et poilues, avec des feuilles composées pennées et de nombreuses folioles ovales. Les fleurs sont de couleur blanche, lilas ou bleu pâle. Les gousses sont larges et lisses, mesurent de 8 à 40 mm de long et 6 à 15 mm de large. Chaque gousse porte 1 à 2 graines fines, en forme de lentille. (Street et al ., 2008) (Figure 01).



Figure 01 : Plantes de lentilles(A), Gousses (B), Grains (C)

(Schwartz et Langham, 2012).

2-1-2- Données génétiques

Lens culinaris est une plante diploïde avec 14 chromosomes ($2n=14$) (Arumuganathan et Earle, 1991), elle est autogame et le taux de pollinisation croisée est inférieur à 1 % selon Wilson et Law (1972). L'androcée est constitué de dix étamines minuscules, dont neuf sont soudées entre elles ; par contre, le pistil est constitué d'un stigmate, d'un style et d'un ovaire, et ce dernier renferme habituellement deux ovules. La pollinisation a normalement lieu juste avant l'ouverture de la fleur (Muehlbauer et al., 1980).

2-1-3-Position systématique

Lens culinaris est une espèce de plantes dicotylédones appartenant à la famille des *Fabaceae* ou légumineuses (Tableau 01), Sa classification systématique est la suivante :

Tableau 01: Classification des lentilles (Cokkizgina *et al.*, 2013).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Lens</i>
Espèce	<i>Lens culinaris</i>

2-1-4-Variétés

Les cultivars de lentilles sont classés généralement selon la couleur et la taille des graines. La division la plus admise regroupe les lentilles en 2 groupes (Begiga, 2006).

a- Groupe *Microsperma*

Ce groupe est caractérisé par des petites fleurs (de 5–7 mm de long) de couleur bleu-violet à blanches ou roses, les gousses sont petites et les graines sont aussi petites (diamètre inférieur à 6 mm). Ce groupe domine en Asie, en Egypte et en Ethiopie (Begiga, 2006).

b- Groupe *Macrosperma*

Les fleurs sont grandes (de 7–8 mm de long) de couleur blanches (rarement bleues), les gousses sont grandes, généralement plates et les graines sont aussi grosses (diamètre supérieur à 6 mm). Ce groupe prédominant en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique (Begiga, 2006).

En Algérie, plusieurs variétés sont cultivées parmi lesquelles on cite :

- ✓ La large blonde Métropole : elle est isolée en 1942 en France, elle est de couleur verdâtre et de bonne qualité culinaire.
- ✓ La large blonde de Chili : elle isolée en 1952 au Chili, les graines sont larges, de couleur verdâtre elle est aussi de bonne qualité culinaire.

- ✓ large verte Algérie : elle est isolée en 1950 en Tiaret, elle est aussi de bonne qualité culinaire.
- ✓ La Syrie 229 : c'est une sélection locale sur population introduite de Syrie, les grains de cette variété sont arrondis de couleur vert-jaune, elle est de très bonne qualité culinaire.
- ✓ La Balkan 755 : elle est aussi une sélection locale sur population introduite dans la région de Sersou, ces grains sont larges de couleur marron elle est aussi de bonne qualité culinaire (ITGC, 2013) (Figure 02).

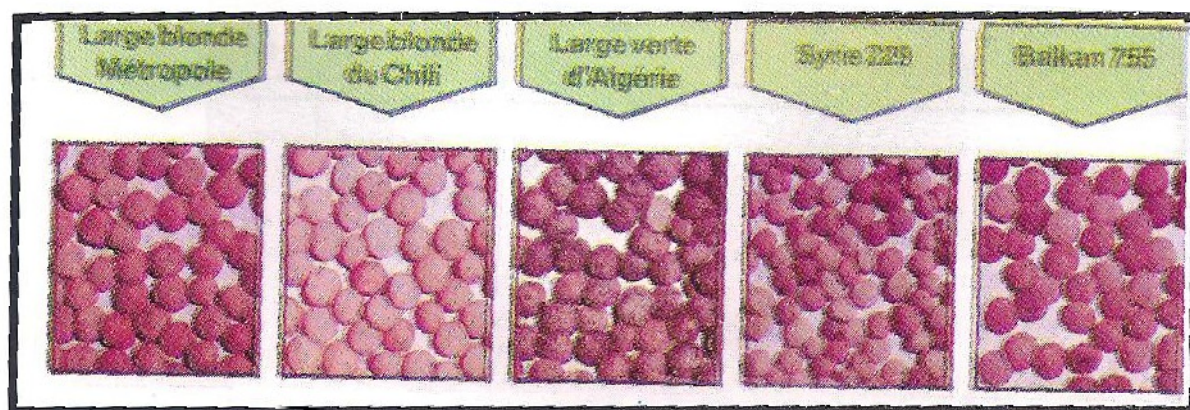


Figure 02 : Les différentes variétés des Lentilles cultivées en Algérie (ITGC ; 2011).

2-1-5- Cycle biologique

Lorsque les températures sont optimales, les graines de lentilles germent en 5 à 6 jours et la floraison débute entre la 6 et les 7 semaines après le semis. Le cycle de croissance est de 80 à 110 jours pour les cultivars à cycle court et de 125 à 130 jours pour les cultivars à cycle long (Begiga, 2006) et il comprend deux phases (Schwartz et Langham, 2012).

a- phase végétative : cette phase comprend deux stades : la croissance et la production des feuilles.

b- phase reproductive : elle est représentée par la floraison, la fructification et la production des graines (Figure 03).



Figure03 : Cycle biologique des légumineuses : 1- graine ; 2- Germination ; 3- Croissance ; 4- Floraison ; 5- Fructification. (Anonyme 1,2014)

2-1-6- Culture et Production

a- Culture

Les plantes de lentilles sont cultivées comme des annuelles d'été dans les zones tempérées et comme des annuelles d'hiver dans les régions subtropicales. Ces plantes poussent à des températures moyennes de 6 à 27°C, des précipitations annuelles comprises entre 300 et 2400 mm et des valeurs de pH entre 4.5 et 9.0 (Begiga, 2006).

b-Production

La production mondiale de lentilles est estimée à 2,8 millions de tonnes elle est dominée par trois pays : Canada, l'Inde et la Turquie avec environ 70% de production mondiale (Cokkizgin A, 2013). Par contre, en Algérie, la culture des lentilles n'occupe que 1.5% de la totalité des terres réservé aux légumineuses alimentaires (Ait Abdellah *et al.*, 2011).

La culture des lentilles s'étalent sur de grand surface dans les hautes plaines (Tiaret, Saida, Sétif) et les plaines intérieures (Bouira, Médéa, Mila) (Figure 04) (Chouaki, 2006).

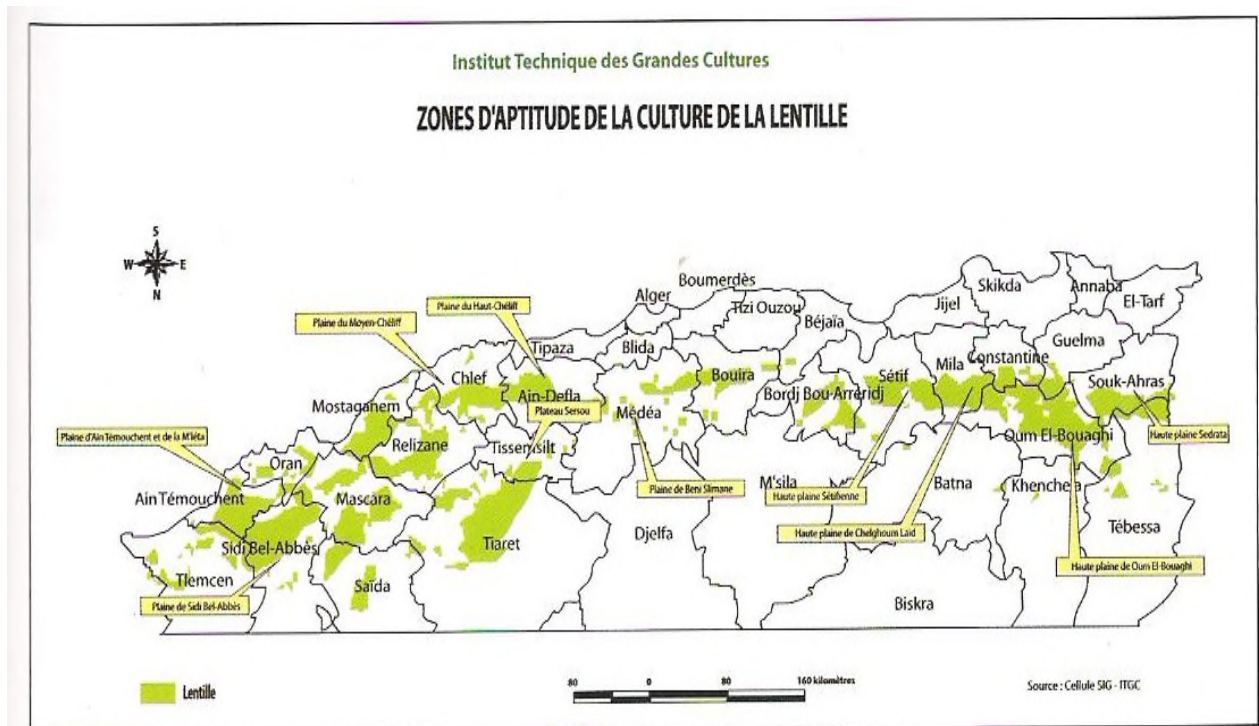


Figure 04: Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC ,2010).

La production Algérienne des légumineuse demeure très faible depuis des années ceci est dû principalement au mode de culture traditionnel, l'indisponibilité des semences de qualité, l'absence de la mécanisation et d'expérience....etc. (Ait Abdellah *et al.*, 2011).

2-2- Phytopathologies des lentilles

Durant la vie végétative, stockage ou commercialisation des lentilles plusieurs maladies peuvent survenir au produit provoquant ainsi de grave dégât et des pertes de rendement (Bayaa *et al.*, 1986), parmi les principaux contaminants d'origine fongiques qui infectent les lentilles on distingue :

2- 2-1- La rouille

La rouille est provoquée par *Uromycesviciae-fabae* qui cause de graves dégâts allant à la perte totale du rendement (Chen et al, 2011). Cette maladie affecte surtout les parties aériennes (feuilles et tiges), elle est caractérisée par l'apparition de taches marron à noirâtres (Douci-Khalfi, 2011) (Figure05).



Figure05: La rouille de lentille(A) et agent responsable de maladie (B)
(Douici -Khalfi ,2011).

2-2-2-L'anthracnose

Cette maladie est provoquée par *Colletotrichum truncatum* (Kaiser *et al.* ,1998), qui cause des lésions nécrotiques sur les tiges, les feuilles et les gousses, et peut causer la mort de plante et les pertes de rendement (Buchwaldt *et al.*, 1996).



Figure06 :L'anthracnose de lentille (Anonyme 2, 2014).

2-2- 3- L'ascochytose

Cette maladie se manifeste sur les tiges, les feuilles et les gousses sous forme de taches nécrotiques provoquées par *Ascochyta fabae*. Les pertes de rendement peuvent atteindre 50 % si la culture n'est pas traitée (Godwin ,2005) (Figure 07) .



Figure07 :L'ascochytose de lentille (Douici-Khalfi ,2011).

2-2-4-La pourriture grise

Cette maladie est causée par *Botrytis cinerea* où les parties infectées prennent une couleur grise ou brune. L'agent pathogène provoque des pertes importantes de feuilles des plants infectés avec une importante perte de graines conduisant une diminution du rendement jusqu'à 70 %. (Goodwin, 2005)



Figure 08 : La pourriture grise de lentille(A) et agent responsable de maladie (*Botrytis cinerea*) (B) (Hawthorne, 2012; Sakhr, 2009).

2- 2-5-La Fusariose

C'est la maladie la plus répandue des lentilles en Algérie (Sayoud *et al.*, 1999), elle est provoquée par *Fusarium oxysporum* qui cause une morte précoce des plantes. Les premiers symptômes sont observés au niveau du système racinaire (Douici -Khalfi ,2011).

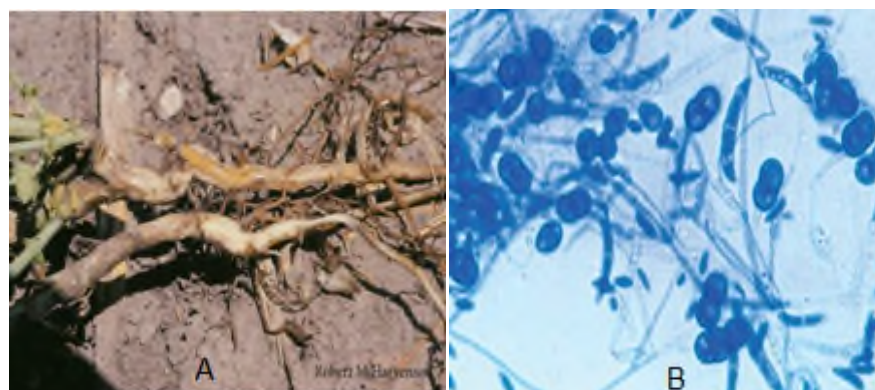


Figure09 : La fusariose de lentille (A) et agent pathogène responsable de maladie (B) (Anonyme 2 ,2014 ; Chabasse ,2002).

2-2-6- Autres maladies

Plusieurs autres maladies d'origines fongiques peuvent être observées sur des champs de lentilles tels que le Mildiou, la pourriture racinaire, l'Alternariose...etc

2 -3- Lutte biologique

Le terme "lutte biologique" recouvre différents concepts selon les disciplines impliquées dans la protection des cultures (Nordlund, 1996 ; cité par Sakhr, 2009). La définition officielle par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) stipule que la protection biologique est « l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ».

Le principe de la lutte biologique est basée sur l'exploitation par l'homme et à son profit d'une relation naturelle entre deux êtres vivants :

- la cible (de la protection) est un organisme indésirable, pathogène ou ravageur d'une Plante cultivée, mauvaise herbe, etc .
- l'agent de protection (ou auxiliaire dans le cas des ravageurs) est un organisme différent, le plus souvent un parasite (ou parasitoïde), un prédateur ou un agent Pathogène du premier, qui le tue à plus ou moins brève échéance, éventuellement en s'en nourrissant, ou tout au moins qui limite son développement (Cook et Baker ; 1984 cité par Sakhr, 2009).

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes offre un potentiel très prometteur et viable par la diversité des agents microbiologiques. Beaucoup d'antagoniste existent certainement dans la nature et exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogène des plante L'homme a toujours essaye d'augmenter l'efficacité des antagonistes a travers l'introduction de nouvelle et grande population de ces microorganismes au champ ou elles n'existent pas ou a travers la stimulation de leurs croissance en apportant des amendements au sol, dans les deus cas le résultats est un accroissement des activité inhibitrice des antagoniste contre les pathogènes. (Nasroui B ,2006)

Ces microorganismes antagonistes peuvent être des bactéries comme (*Pseudomonas* ; *Bacillus* ; *Streptomyces*) ou des levures comme (*Pichia guilliermondii*), des virus (Virus de la granulose) ou des champignons (*Trichoderma*, *Penicillium* ,*Sporidesmium*). Parmi les champignons le plus connues il existe des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium* ; particulièrement *T. harzianum* et *G. virens* ; qui sont efficaces contre plusieurs pathogène s comme des espèces de *Pythium* ; *Phytophthora* ;*Sclerotinia* ;*Fusarium*...etc. (Nasraoui, 2006 ;Lefort ,2010).

2- 4- Le champignon *Trichoderma*

2-4-1- Généralités

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Rouso, 1985; Bisset, 1991).

Ce terme désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes» (Fujita *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996 ; Cité par Benkada, 2006).

Les *Trichoderma* sont des agents potentiels surtout en agroalimentaire grave à leurs production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide (Prieto et al, 1997 ; cité par Benkada, 2006). Plusieurs genres de *Trichoderma* ont montré durant les années passés des effets appréciables en lutte biologique en raison de leurs effets antagoniste vis-à-vis d'autres espèces fongiques pathogènes tels que *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*... (Grondona *et al.*, 1997 ; Cité par Benkada ,2006).

Les espèces du genre *Trichoderma* se développent a une température optimale qui se situe entre 25°C et 30°C avec un minimum de 0°C et un maximum de 30 à 37°C (Gary *et al.*, 2011).

2-4- 2- Systématique

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp* .représente comme suit :

Tableau 02 : Classification de *Trichoderma sp* (Gary et al ,2011).

Embranchement	<i>Amastigomycota et/ou Eumycètes</i>
Sous-Embranchement	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Sordariomycètes</i>
Ordre	<i>Hypocréales</i>
Famille	<i>Hypocracea</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>

En 1991, Bissett a divisé les espèces de *Trichoderma* en cinq sections (Figure 10)

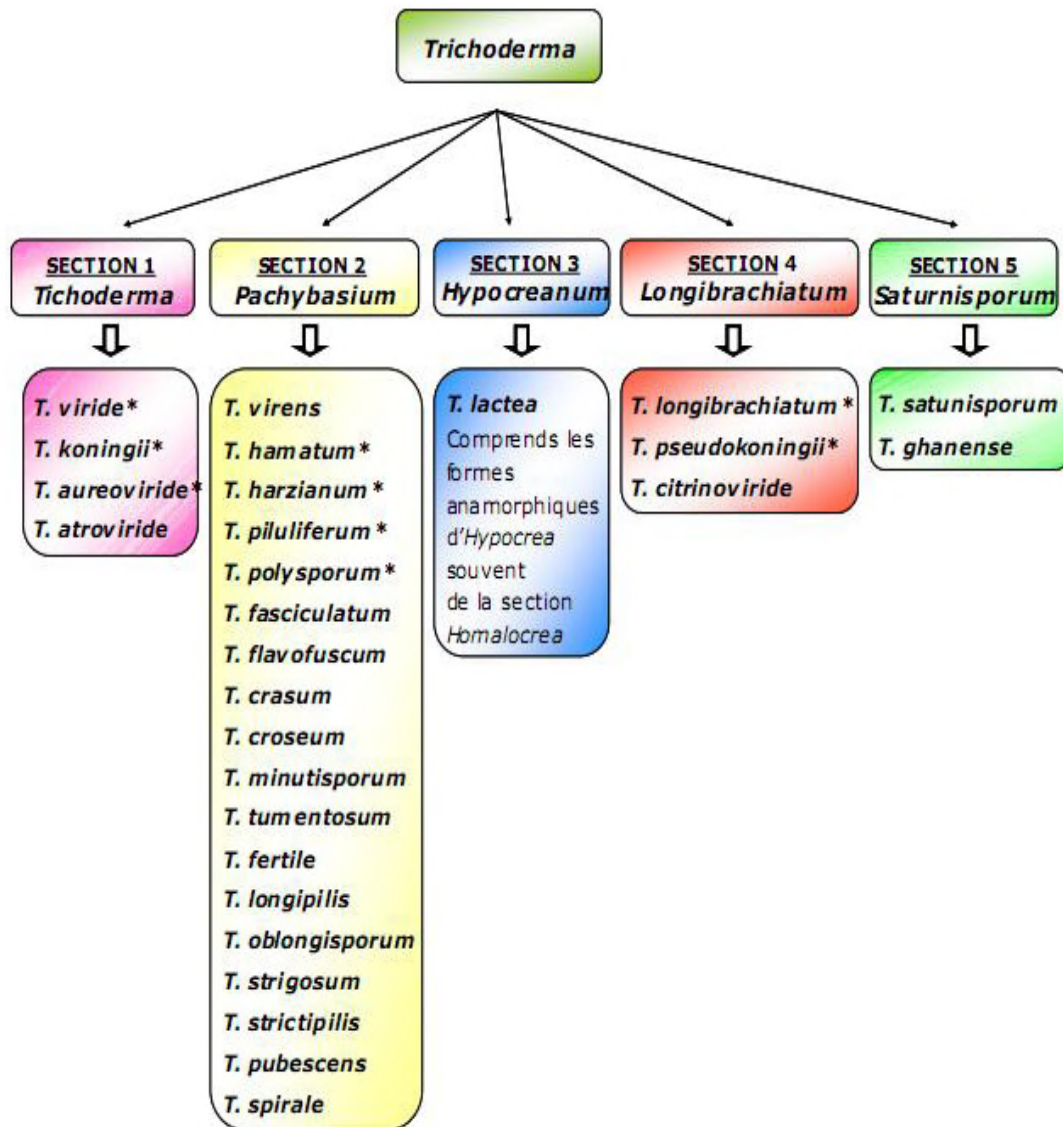


Figure10 : Les cinq sections systématiques de *Trichoderma sp* et quelques-unes des espèces y appartenant Bissett (Bissett, 1991) * Les espèces agrégées de Rifai (1969).

2- 4-3- Ecologie

Les *Trichoderma* sont des champignons cosmopolites et ceci grâce à leurs grandes capacités d'adaptation aux différentes conditions climatiques. En effet, les *Trichoderma* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser les différents substrats, ils font donc les éléments majeurs de la microflore terrestre et marine.

Les *Trichoderma sp* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) à toutes les latitudes et sur les végétaux en décomposition, ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivante (Gary *et al.*, 2011).

2- 4 -4- Morphologie

L'aspect macroscopique des *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes, entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires (Figure 11). Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

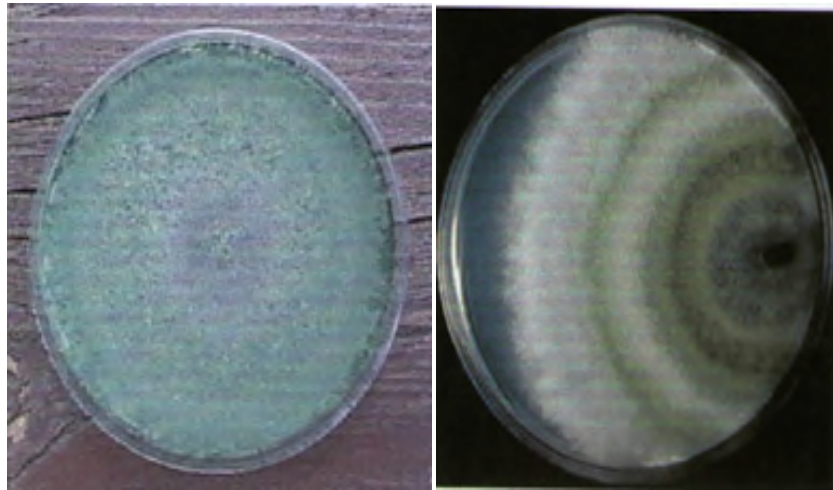


Figure11 : Aspect macroscopique de *Trichoderma sp* (Anonyme 3,2014) .

Sous microscope optique, un mycélium peut être observé, il est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles (Figure 12). A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies). (Kubicek et *al.*, 2003 ; cité par Benkada, 2006).



Figure12 : Aspect microscopique de *Trichoderma sp*. (Anonyme 3,2014)

2-4-5- Cycle biologique

Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse (Figure 13).

D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16ème et le 20ème jour un feutrage épais se superpose à la culture (Corbaz, 1990).

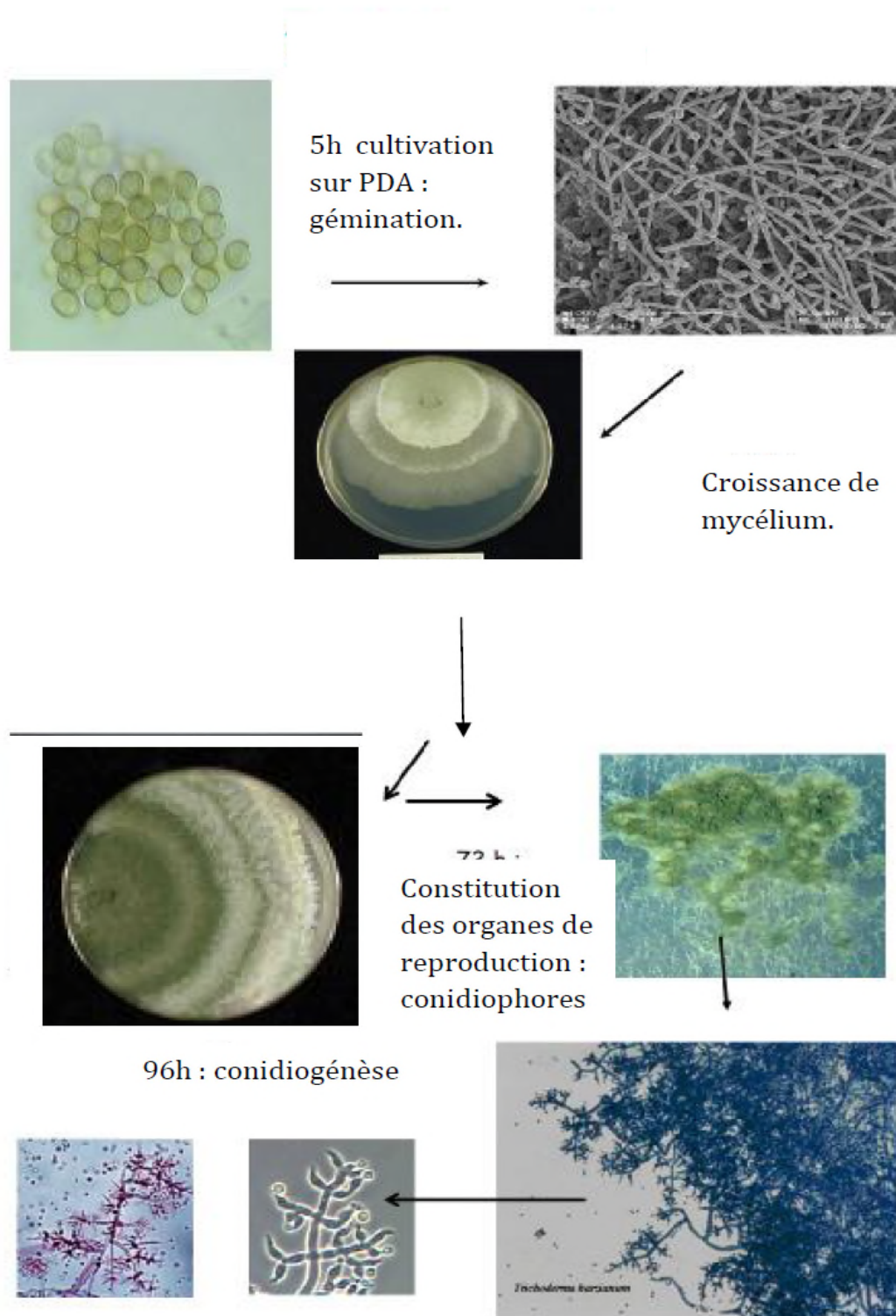


Figure13 : Cycle de vie *Trichoderma* (Anonyme4, 2014)

2-4-6-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), concernant un antifongique (Papavisaz, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino *et al.*, 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990). La littérature ne cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp*, qui sont principalement des enzymes et des molécules bioactives.

a- Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à une autre. Elle est caractérisée principalement par la production des xylanases ou des cellulases (Sandgren *et al.*, 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubikrck *et al.*, 2003).

b - Production de substances bioactives

Les principales substances bioactives du genre *Trichoderma* sont illustrées dans le tableau 03 ci-dessous (Benkada, 2006).

Tableau 03 : Les principales substances bioactives de *Trichoderma sp*.

Métabolites volatils	6 pentyl _ pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes (Vizscaino <i>et al.</i> , 2005)
Métabolites non volatils diffusibles	Polyacétates (antifongiques, antibiotiques), Trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les Trichodermines (Blumenthal, 2004).
Métabolites polypeptidiques	Ciclosporines (immunosuppresseurs, anti-inflammatoire) et les peptaïbols (Landreau, 2001)

c - La biosynthèse des acides aminés

Trichoderma sp comme tous les autres champignons sont capables de synthétiser les 20 Acides Aminés (AA) usuels des deux séries L et D. Le rythme de croissance élevé chez les *Trichoderma sp* leurs permet d'assimiler rapidement l'ammoniaque.

La biosynthèse des AA est initiée par la production de glutamate qui est rare et précieux dans la nature, car il est la trame de synthèse du reste des AA et se trouve de ce fait à des concentrations élevées dans les cellules vivantes (Ahmed *et al.*, 1995 ; Voet, 1998).

2 -4-7- Modes d'actions des *Trichoderma*

Les propriétés antagonistes des *Trichoderma sp* sont connues depuis longtemps (première publication en 1887). 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. Les *Trichoderma sp* ont la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action :

a-L'antibiose

Dans ce cas, *Trichoderma sp* produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible. Ces métabolites produits à faibles concentrations agissent comme des « antibiotiques » et peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (Montensino *et al.*, 2009). L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de protection biologique (Jacobsen, 2006 ; cité par Sakhr, 2009).

b- La compétition

Elle 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. Dans le cas de compétition *Trichoderma sp* occupe les lieux avant l'arrivée des pathogènes (Caron, 2002).

c- Le parasitisme

Trichoderma sp est un parasite qui reconnaît spécifiquement sa cible, s'enroule autour de celle-là soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui la détruisent. 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 (Caron, 2002).

2 -4-8-*Trichoderma* comme fongicide commercialisé

Comparées aux produits chimiques, la production et la commercialisation d'organismes antagonistes sont beaucoup plus difficiles parce que ces antagonistes doivent être récoltés, emballés et délivrés sous une forme viable et stable. Une fois appliquée à la culture ou dans le sol, les antagonistes doivent croître et persister dans l'environnement pendant suffisamment de temps pour exercer un contrôle contre les pathogènes (Nasraoui ,2006).

Une technique de production massive des spores de *Trichoderma sp* a également été mise au point (Caron et al ., 2003). En production commerciale, *Trichoderma sp* a permis d'accroître les rendements de 7% par rapport aux parcelles traitées chimiquement (Caron et al ., 1994). Par contre, pour que *Trichoderma sp* soit efficace, il doit être appliqué en prévention.

Selon Caron (2002), l'emploi de l'agent biologique *Trichoderma sp* tel qu'il est disponible actuellement, permettrait de :

- ✓ Restreindre l'utilisation de fongicides en agriculture : protection du consommateur et de l'environnement;
- ✓ Favoriser le développement des plantes en l'absence d'agents pathogènes dans les substrats (Effet stimulant);
- ✓ Survivre et se multiplier dans les substrats pour toute la période de germination et de production des semis;
- ✓ Lutter efficacement contre plusieurs agents pathogènes présents en même temps dans un substrat;
- ✓ Offrir un produit facile à manipuler, disponible sous forme de poudre mouillable, pour les arrosages ou les incorporations directes au substrat.

3- Matériels et Méthodes

3-Matériels et Méthodes

Le présent travail porte sur l'étude de quelques maladies fongiques des lentilles et de mettre en évidence l'effet de l'agent antagoniste *Trichoderma sp* sur les souches pathogènes les plus répandues. Pour atteindre cet objectif notre travail a été effectué en deux étapes:

1^{ère} étape prospection et étude sur sites : une sortie sur terrain a été faite le 19 Mars 2014 dans la région d'Ouled Hamla (Ain M'Lila) wilaya de Oum -EL- Bouaghi présentée par un champ des lentilles traité par des pesticides chimiques. Ainsi d'autres prélèvements ont été faits au sein de campus de Chaab Rssas à partir d'une zone d'étude des lentilles non traitée.

2^{ème} étape étude mycologique : cette étude a été effectuée au sein du laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et l'Activité Microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'université Constantine 1. (Situé à Biopole Chaab Rssas).

3-1- Présentation des zones d'étude (Ouled Hamla et Chaab Rssas)

➤ Ouled Hamla : c'est une commune située dans la Daïra d'Ain M'lila - Wilaya d'Oum-El-Bouaghi - Algérie. Bordée par la commune de Teleghma (wilaya de Mila) au nord-ouest, par la commune de Souk Naamane au sud-ouest, par la commune de Khroub (wilaya de Constantine) au nord-est, et par Ain M'lila au sud-est, la commune d'Ouled Hamla couvre une superficie de 152 km². Ses coordonnées géographiques sont 36 ° 05 ' 00 "Nord et 6 ° 28' 00" Est. Les principales cultures ont été maintenues au fil des siècles, notamment la céréaliculture (culture du blé, de l'orge...). Les autres productions agricoles importantes incluent la pomme de terre, la tomate, le poivre, la carotte, les lentilles... etc.

➤ Chaab Rssas : c'est une région située à Constantine adjacente à l'Université Constantine 1 l'une des wilayas de l'EST Algérien, elle est limitée au Nord par la wilaya de Skikda, Au Sud par la wilaya d'Oum-El-Bouaghi , à l'Est et à l'ouest par les wilayas de Mila et de Guelma respectivement. La région de prélèvement des échantillons est située à une altitude de 649 mètres, ses coordonnées géographiques sont : 36° 17' 00" N et 6° 37' 00" E. La région de Constantine est caractérisée par un climat semi-aride. La température maximale est entre 25-45° en été et le minimal est entre 0-12° en hiver.

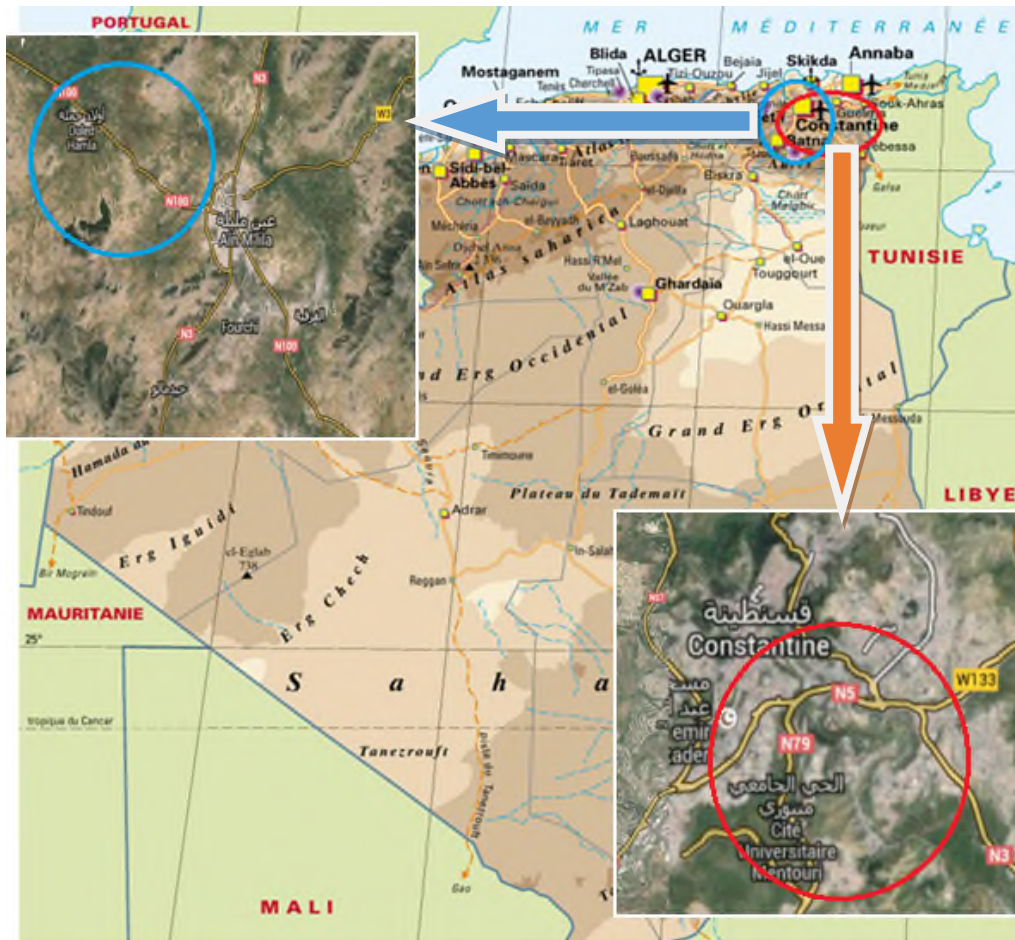


Figure 14 : Cartes d'Algérie représentant les zones d'échantillonnages de Constantine et Oum-El-Bouaghi. (Anonyme4, 2014 ; Anonyme 5,2014).

3-2- Prélèvement des échantillons

Suite à des observations approfondis à l'aide d'une loupe sur champs, des plantes jugés infectés ont été prélevés dans des sacs en papier et transporté au laboratoire pour l'examen mycologique.

NB :

Les échantillons prélevés de Ouled Hamla sont des échantillons traités par des pesticides par contre ceux de Chaab Rssas ne sont pas traités (figure 17).



Figure 15 : Jardin de Chaab Rssas (A) , Champ de Ouled Hamla (B).

3-3- Etude mycologiques des plantes infectées

3 -3-1- Préparation des milieux des cultures (voir annexe)

Le premier isolement des mycètes on s'est basé sur le milieu PDA jugé comme milieu standard pour le développement des champignons. Par contre, la purification des souches on a employé les milieux Czapek Dox et le Sabouraud.

3-3-2- Méthode d'isolement

Les plantes jugées infectés (figure 15) ont été découpés en petits fragments d'environ 1 cm, puis traité comme suit :

- ✓ Lavage a l'eau de robinet pendant 2 min dans l'objectif d'éliminé les impuretés ;
- ✓ Lavage pendant 1 min dans l'eau de javel pour désinfections ;
- ✓ Un second lavage dans l'eau distillée stérile afin de débarrasser les éventuels contaminants ;
- ✓ En fin, séchage dans du papier Wattman N°1 stérile et mises dans des boites de Pétri préalablement remplis de milieu de culture PDA additionné d'un antibiotique afin d'inhiber la croissance des bactéries.

Au cours de cette étude, 5 répétitions pour chaque parti de plante ont été effectués. L'incubation des boites est effectuée à 20°C pendant 7 jours.



Figure 16 : Echantillons des plantes infectés.

3-3-3- Purification des souches

Les boîtes issues d'isolement comprennent plusieurs colonies d'aspects, de couleurs et de texture différentes. La purification des colonies a concerné les colonies dont les caractères culturels correspondent à ceux des souches recherchées dans cette étude (souches pathogènes). La technique consiste à prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle à repiquer, à l'aide d'une Anse de platine stérile et transférer aseptiquement dans une boîte de Pétri contenant l'un des milieux Sabouraud ou bien Czapek Dox. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (Botton *et al.*, 1990).

3 -3-4- Identification des isolats

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : Une observation macroscopique (aspect des colonies et leur revers) et une observation microscopique (nature des filaments, aspect des spores, des conidiophores ...), ceci est largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées (Botton *et al.*, 1990 ; Cahagnier et Richard –Molarde, 1998).

a-Identification macroscopique

L'examen macroscopique permet de déterminer la texture (velouté, laineux, etc..) et la couleur du thalle (pigmentation du mycélium, couleur des conidies) pendant le développement ainsi que la couleur du revers de la culture et son odeur (Botton *et al.*, 1990).

b- Identification microscopique

Les caractères microscopiques sont révélés suite à une préparation simple pour microscope optique qui se fait comme suit :

-Un petit morceau de scotch est appliqué par sa face collante sur la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une goutte de lactophenol bleu coton sur une lamelle propre.

- on chauffe l'égerment en passant la lame sur une flamme faible de bec bunsen sans laisser sécher le colorant sur la lame.

-enfin les lames préparées seront observées au microscope optique aux différents grossissements jusqu'à l'immersion (G x 100).

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (Absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores,..) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes, etc...) (Botton *et al*, 1990 ; Chabasse *et al*, 2002).

3-3-5- Conservation des Isolats

a- Préparation de milieu de conservation

-Pour la conservation des souches prélevées on a utilisé le milieu PDB avec glycérol (voir Annexe).

b- Méthode de conservation

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée, consiste à repiquer les souches en tube sur gélose liquide, les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 28°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Botton *et al*, 1990).

3-4-Test d'antagonisme *In vitro*

Le choix d'un milieu de culture adéquat est indispensable au bon développement du pathogène et de l'antagoniste. Le milieu PDA assure de bonnes conditions de cultures pour agents pathogènes et pour *Trichoderma sp* (Comporta, 1985).

L'activité antagoniste *in vitro* du *Trichoderma sp* vis-à-vis des agents pathogènes été étudiées selon deux méthodes :

3- 4-1- Confrontation direct

Principe

appelée encore « technique des culture opposées », cette technique 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 (Caron J. ; 2002).

Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 5 cm et à équidistance du centre de la boîte (Figure 17) ; les repiquages sont effectués en même temps (Benhamou et Chet ,1996).

L'incubation est réalisée à 25 °C pendant six jours avec une observation quotidienne.

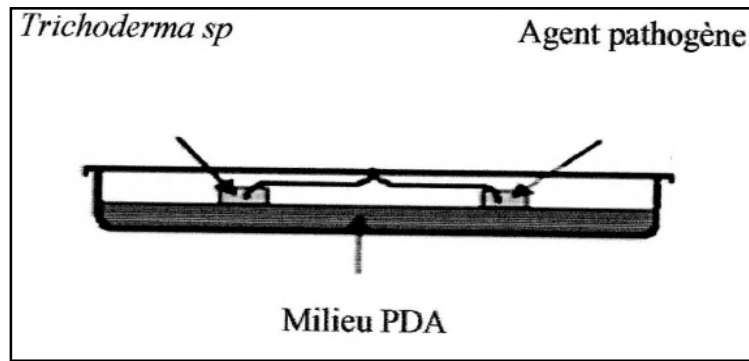


Figure 17: Confrontation direct de *Trichoderma sp* et l'agent pathogène par contact directe sur milieu PDA.

b- Calcul :

Après incubation trois jours à 28°C et à l'obscurité, le pourcentage d'inhibition (*IC*) de la Croissance mycélienne du pathogène par l'antagoniste a été évalué selon la méthode de Sy 1976 :

$$IC\% = (DT - DPA / DT) \times 100$$

DT: croissance diamétrale du témoin.

DPA: croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste.

IC%: Inhibition de la croissance

3-4-2-Confrontation à distance

a- Principe

Le principe de cette méthode repose sur la technique déjà utilisée par Comporta (1985). Il 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 (figure18). 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 7 jours à une température (25°C).

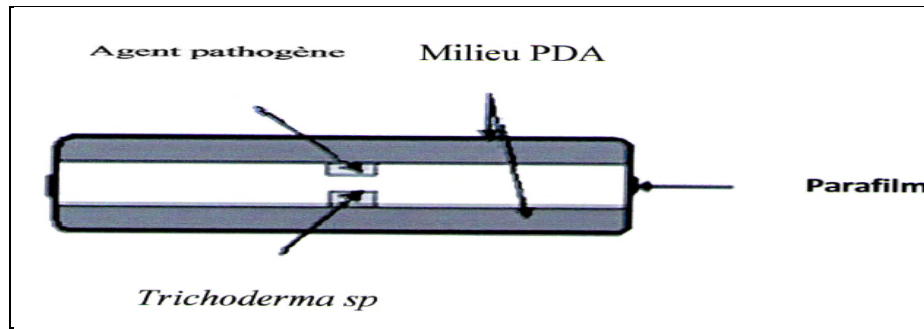


Figure 18: Confrontation à distance entre *Trichoderma sp* et agent pathogène

b-Calcul

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée tous les jours pendant 7 jours. L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma sp* est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996) :

$$I(\%) = (1 - C_n/C_o) \times 100$$

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

C_o : le diamètre moyen des colonies témoins.

3-5 Test *in vivo*

Après les tests d'antagonisme *in vitro* (inhibition de croissance du champignon et production de métabolites secondaires) des tests d'antagonisme *in vivo* ont été effectués en vue de repérer des résultats efficaces de *Trichoderma sp* contre les attaques précoces d'un des pathogènes étudiés.

3-5-1-Préparation du sol

Le sol utilisé pour les essais *In planta* a été prélevé sur le campus universitaire, autoclavé à 121° C pendant 1h puis refroidi avant son utilisation (voir annexe) (Chao *et al.*, 1986).

3- 5-2- Culture des lentilles

La culture des graines des lentilles est réalisée au laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et l'Activité Microbienne de l'université Constantine 1. Le sol préalablement stérilisé est séparé en 9 pots. Ensuite, les grains de lentilles sont imbibés d'eau stérile et placés dans les pots à raison de 40 graines/pots. Les pots préparés sont placés au haut laboratoire adjacent à lumière et arrosés avec de l'eau physiologique chaque deux jours jusqu'au stade requis pour l'inoculation (stade 2 feuilles) (Berber F *et al.*, 2009).



Figure 19 : échantillon des graines des lentilles cultivées pour réaliser le test *In vivo*.

3- 5-3-Fermentation de *Trichoderma*

Pour la fermentation de *Trichoderma sp* (Figure 22) on a employé le milieu MEA (Malt Extract Agar) comme milieu de fermentation (voir Annexe). Le milieu préalablement préparé est stérilisé a été réparti en 5 flacon de 250 mL à raison de 100mL/ flacon. L'ensemencement sur ce milieu se fait par la technique de disques ou implant. A l'aide d'un emporte-pièce stérile, des implants mycéliens de 5mm de diamètre (3 disques) sont préparés sur le pourtour de colonies fongiques de *Trichoderma sp* qui a été fourni par le Laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM) (figure20).L'incubation statique est été faite à 25°C pendant 14 jours.

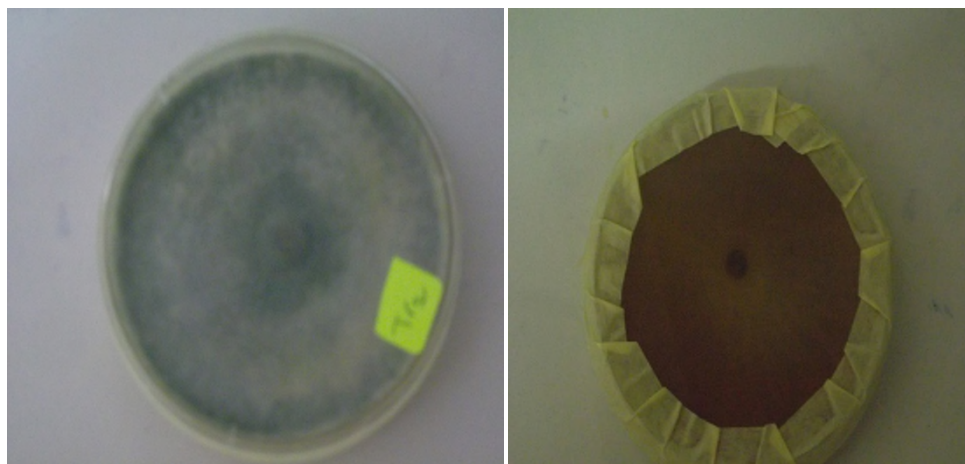


Figure 20 :L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp* Agée 15 jours sur milieu PDA.

3-5-4- Préparation de la solution d'inoculation de *Trichoderma*

Après 14 jours d'incubation au bain Marie, le mycélium ainsi que le milieu de culture sont récupéré et additionné de 1 ml de Tween 80 est agité afin de libéré les spores.



Figure 21 : la Biomasse de *Trichoderma sp* en milieu MEA(A) et Filtration de milieu de fermentation de *Trichoderma sp* (B).

3-5-5-Préparation de la suspension sporale des agents pathogènes

Quatre tubes de 10 ml de l'eau distillé sont versés sur une boîte d'*Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*. Le mycélium et les spores sont mis en suspension en grattant avec une anse de platine stérile ; la solution ainsi obtenue est filtrée sur de la gaze stérile afin d'éliminer le mycélium. Le filtrat est réparti dans des 4 tubes précédents puis centrifugé pendant 3 minutes. (Adam A, 2008).

3- 5-6- Inoculation de l'antagoniste et du pathogène

Au stade deux feuilles, les plantes préparé pour le test *In Planta* sont pulvérisée avec la solution de *Trichoderma sp* (issue de fermentation) a une concentration final de 6.2×10^6 spores/ml.(Figure 22).

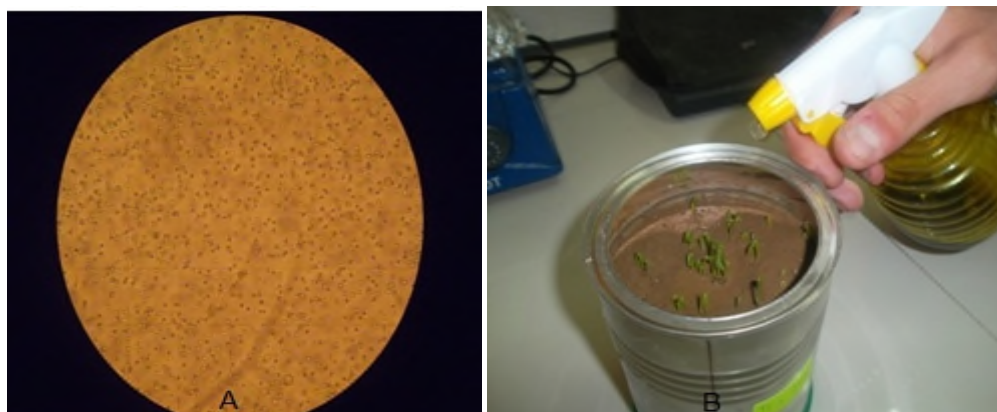


Figure 22 : comptage des spores de *Trichoderma sp* par cellule de Thoma (A) et pulvérisation de plantes de lentilles par filtrat de *Tirchoderma sp* (B).

Après 48h une suspension sporale de l'agent pathogène est pulvérisée de la même façon sur les plantes déjà traitée par l'agent antagoniste. En fin, les plantes sont mise a germée jusqu'au stade floraison pour évaluer le pourcentage d'inhibition ainsi que le pourcentage de pathogénicité.

NB : La détermination de concentration finale des agents pathogènes et antagoniste se fait par cellule de Thoma.

Selon Fachverlag H. C (2001) le comptage des spores ce fait par la loi suivante:

$$N = (n/v) \times f$$

N : nombre de spore par ml

n : nombre moyen des spores comptées

v : volume de comptage

f : facteur de dilution

La concentration sporale des agents pathogènes testés obtenu est représentée sur le tableau suivant :

Tableau4 : La concentration sporale de chaque agent pathogène.

Agents pathogènes	La concentration sporale (spore/ml)
<i>Aspergillus sp</i>	9×10^6
<i>Alternaria sp</i>	3×10^6
<i>Fusarium sp</i>	8×10^6
<i>Penicillium sp</i>	6×10^6

4 -Résultats et discussions

4- Résultats et discussions

Ce travail porte sur l'étude des maladies de *Lens culinaris* et la mise en valeur des effets de *Trichoderma sp* sur quelques moisissures pathogènes, isolées à partir des plantes de la région Chaab Rssas et Ouled Hamla situé dans EST Algérien.

4-1-Isolement et identification des souches fongiques à partir des Lentilles infectées

Sur les dix échantillons prélevés des deux sites, nous avons pu isoler 28 souches fongiques appartenant à 09 genres (Tableau 05). Ces genres sont :

- ***Alternaria sp*** : filaments septés, fin et régulier bruns foncé à noires, dictyspores en chaînes ou bec marqué;
- ***Aspergillus sp*** : conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore sp large et non cloisonné ;
- ***Cladosporium sp***: conidiophores ramifiés et allongés, conidies en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes ;
- ***Fusarium sp*** : conidies unicellulaires ovales, des conidies pluricellulaires falciformes, phialides cylindriques solitaires ou groupées ;
- ***Penicillium sp***: conidies produites par des phialides groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore fin et cloisonné, phialides à col peu développés disposées en pinces serrés ;
- ***Trichoderma sp***: conidies unicellulaires globuleuses, phialides en forme de quille, en verticilles sur des conidiophores ramifiés à angle droit ou sur leurs branches latérales ;
- ***Paecilomyces sp***: les hyphes septés, hyalins, portent des conidiophores qui se ramifient en verticilles, Les phialides à extrémité allongées et effilées sont regroupées en pinceau à l'extrémité du conidiophore.
- ***Chrysosporium sp*** : mycélium végétatif donne naissances à des conidies terminales ou latérales, les conidies sont unicellulaires, ovoïdes ou ampulliforme.
- ***Mucor sp*** : Filaments larges peu ou pas septés, Sporocystophores issus le plus souvent du thalle végétatif, Spores rondes à ellipsoïdales, lisses ou ornementées de spicules.

L'analyse des résultats montre que les racines sont les plus contaminées par les mycètes (46%) suivie par les feuilles (32%), et en finales les tiges avec un pourcentage de 22 %.

Dans les 28 isolats fongiques obtenus le genre *Aspergillus* est majoritaire avec un pourcentage de 39%, suivie par les genres *Penicillium* avec un pourcentage de 17 %, puis le genre *Fusarium sp* avec un pourcentage 11% puis les genres *Alternaria sp* et *Trichoderma sp*

et *Cladosporium sp* avec un pourcentage de 7% de chaque genre. En fin, les genres *Mucor*, *Paecilomyces sp* et *Chrysosporium sp* a un pourcentage de 4% de chaque genre.

La recherche des mycètes à partir dans les échantillons du site de Chaab Rssas a permis d'obtenir un nombre de souches supérieur à celui du site d'Ouled Hamla (Tableau 5).

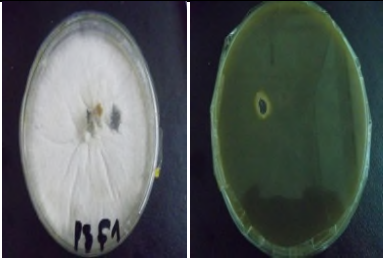
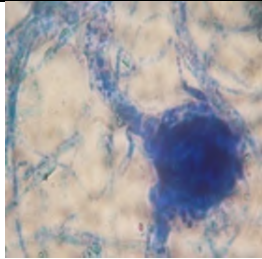

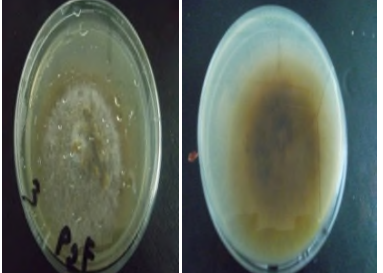
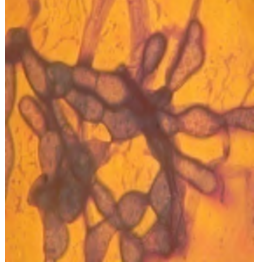

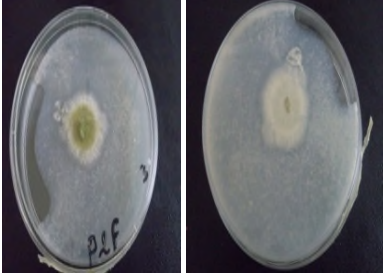
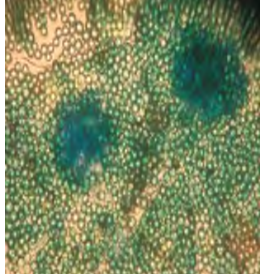
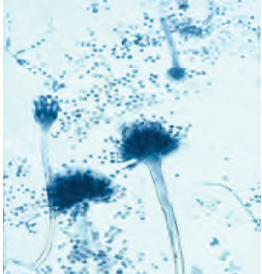
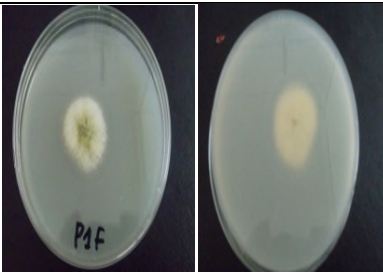
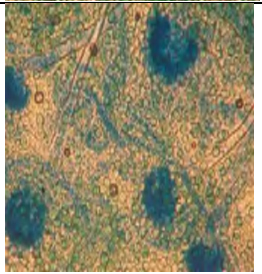
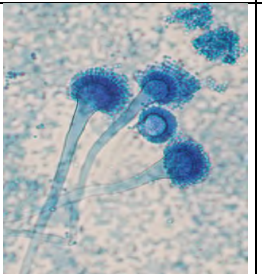
Selon les données climatiques fournies par l'office national de Météorologie (2014), le site prospecté au niveau de la commune Ouled Hamla (Oum- EL Bouaghi), a subit pour le mois de Mars des volumes de précipitation d'environ 44.6 mm (moyenne), une température de 17 °C et une humidité de 51%. Par contre, le site prospecté au niveau de région de Chaab Rssas (Constantine) a subit une moyenne de précipitation voisinant 49.3 mm, une température de 16°C et une humidité de 53 % pendant le même moins.

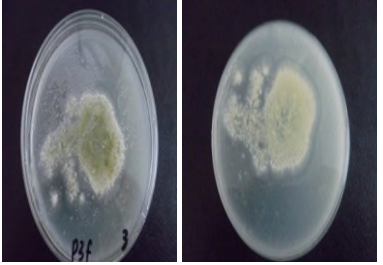
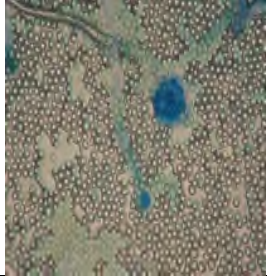
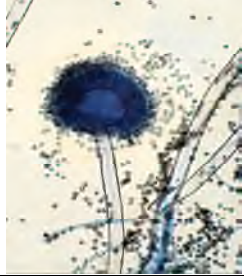
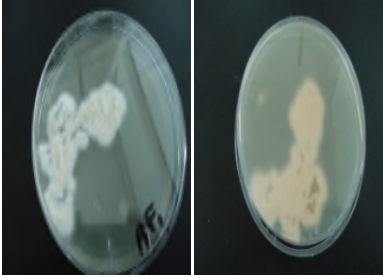
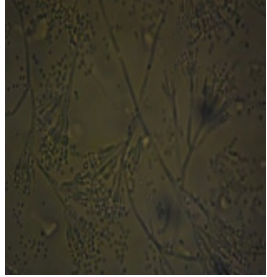
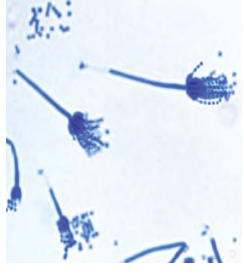
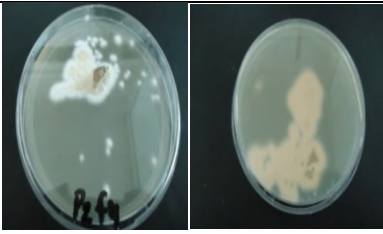
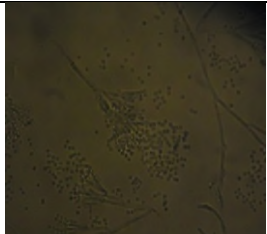
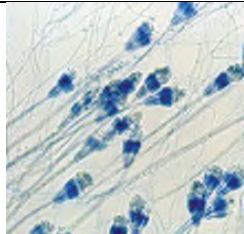
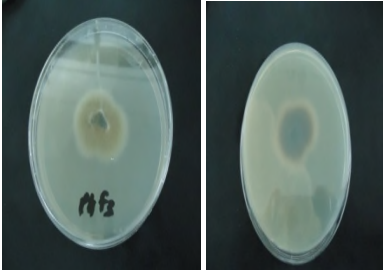
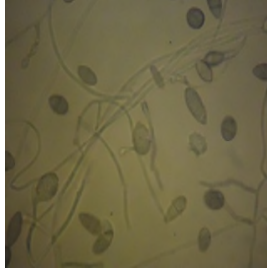
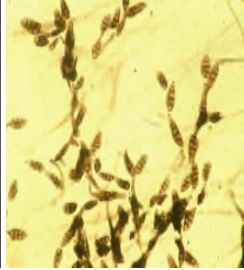
Ces conditions climatiques peuvent être propices au développement des maladies fongiques au niveau des deux sites prospectes. Les résultats que nous avons obtenus sont en relation avec ceux des différentes études menés par Messiaen *et al.*, (1970), Champion (1997), Nasraoui (2006) et Tvoli *et al.*(1997) qui ont montré que le développement des maladies fongiques est favorisées par des températures comprises entre 10-20 °C et par des conditions d'humidité élevées permettant la germination des conidies du pathogène et sa pénétration dans la plante hôte.

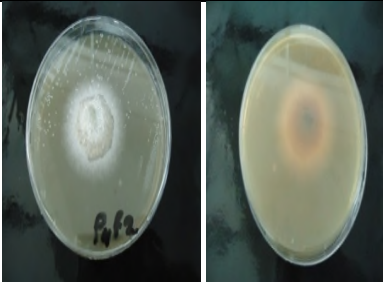
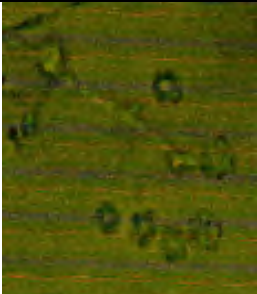
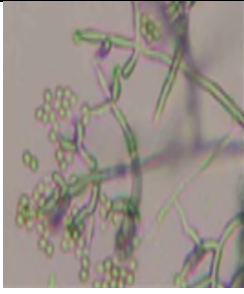
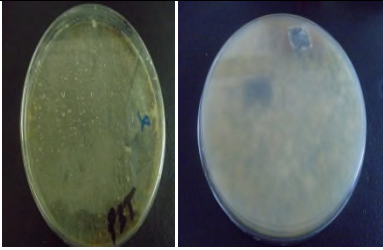
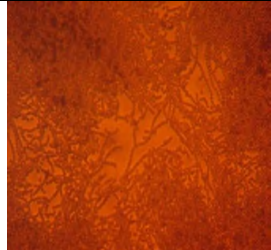
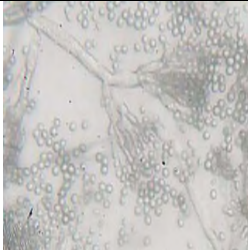
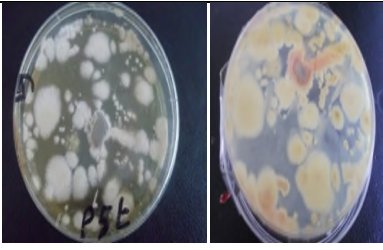
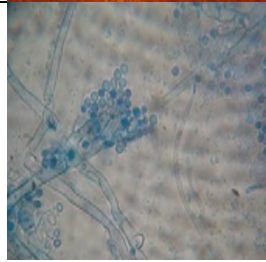

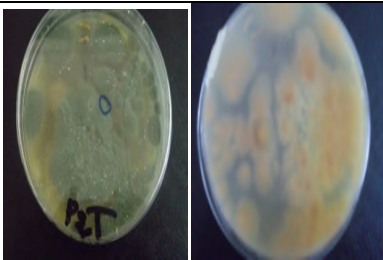
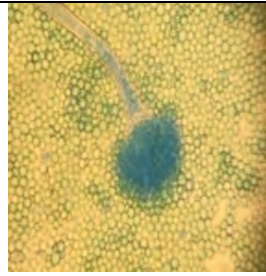
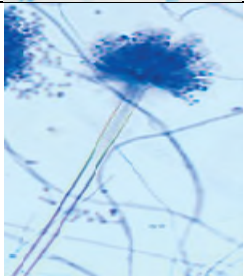
L'identification macroscopique et microscopique que nous avons menée sur les échantillons prélevés a permis de répartir nous souche en 09 genres à savoir : *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Trichoderma sp*, *Paecilomyces sp*, *cladosporium sp*, *Chrysosporium sp*, *Mucor sp*. Les 09 genres identifiés appartiennent généralement aux deux grandes familles des *Zygomycotina* et *Deutromycotina*.

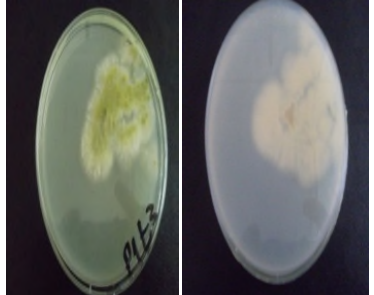
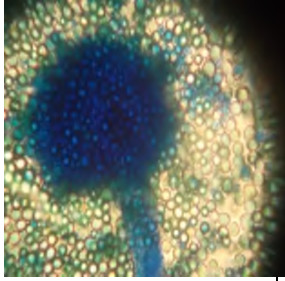
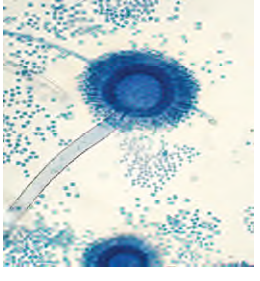
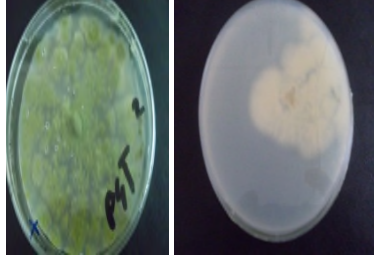
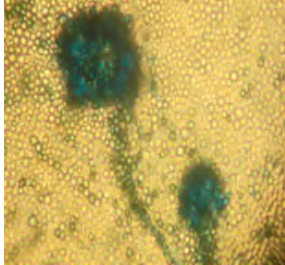
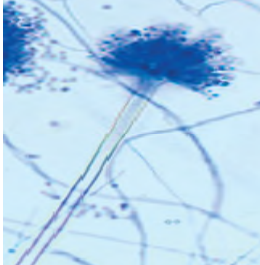
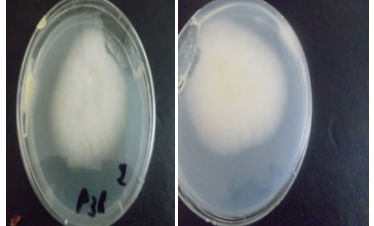


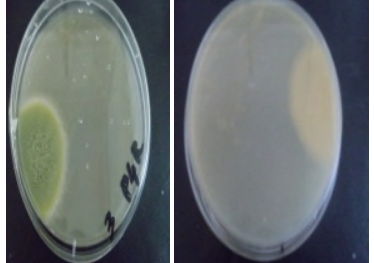
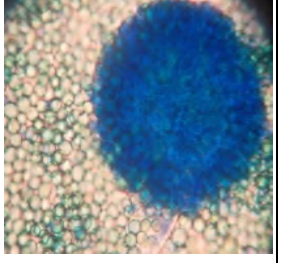
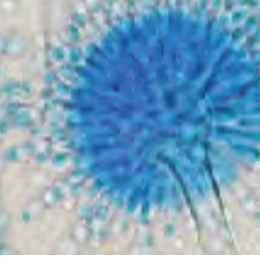
Les caractères de ces genres correspondent parfaitement à ceux décrit par Samson et ses collaborateurs (1981), Botton (1990), Guiraud (1998), Leyral et ses collaborateurs (1998) ainsi que celles de Chabasse et ses collaborateurs (2002).

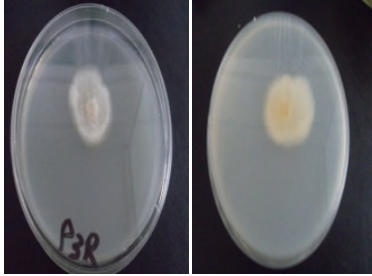


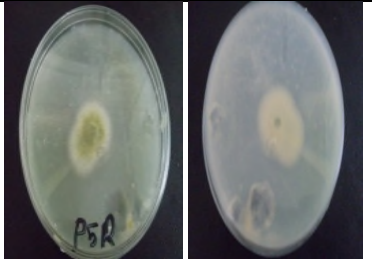

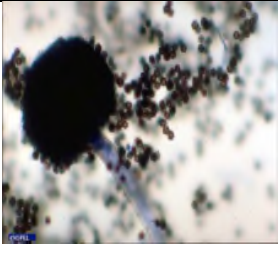
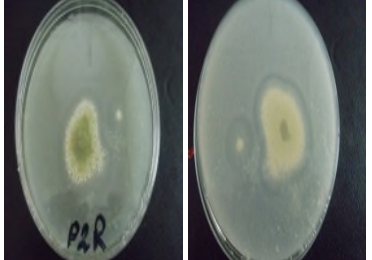
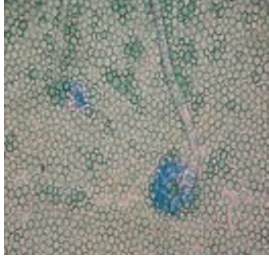
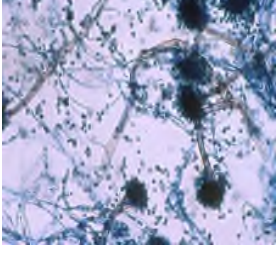
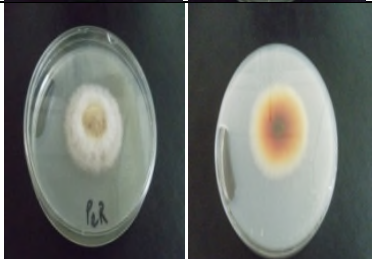
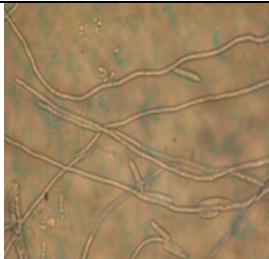

Tableau 05 : Isolats fongiques obtenus des échantillons des Lentilles infectées prélevées à Ouled Hamla et Chaab Rssas


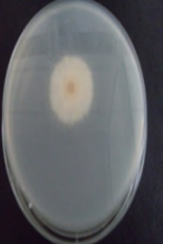
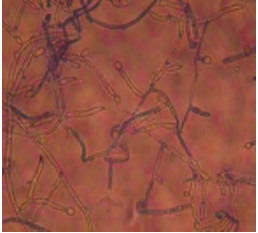
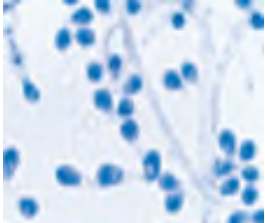

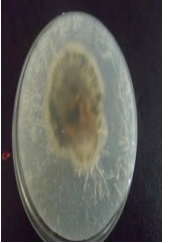

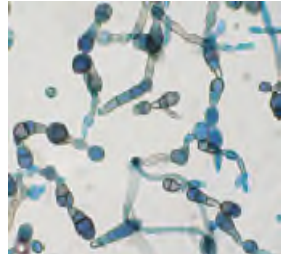



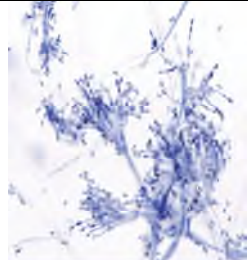

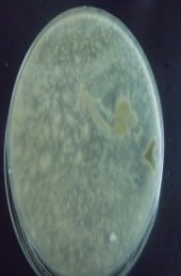
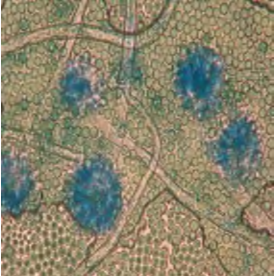

Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique (Recto et verso)	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée
Feuille	Chaab rissas	01				(Anofel, 2014)	<i>Mucor sp</i>
		02				(Chabasse, 2002)	<i>Cladosporium sp</i>
		03				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 1</i>
		04				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 2</i>

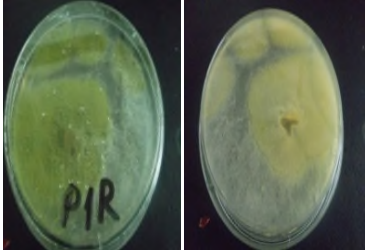



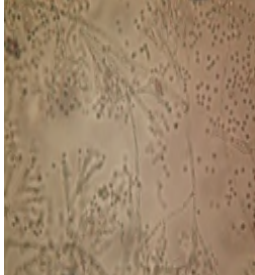

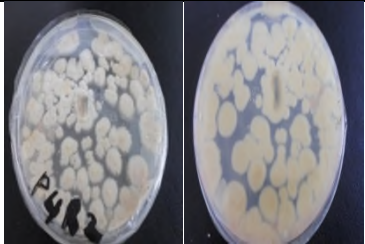

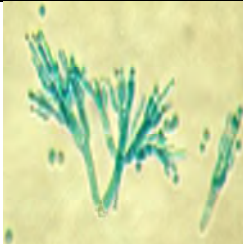
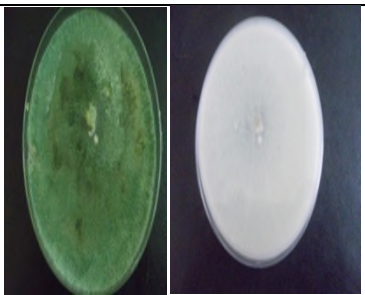


Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique (Recto et verso)	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée
Feuille	Chaab rssas	05				(Chabasse, 2002)	<i>Aspergillus sp 3</i>
	Ouled hamla	01				(Chabasse, 2002)	<i>Penicillium sp1</i>
		02				(Chabasse ,2002)	<i>Penicillium sp2</i>
		03				(Anofel, 2014)	<i>Alternaria sp1</i>

Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique (Recto et verso)	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée
Feuille	Ouled hamla	04				(Rouissi <i>et al</i> ,2008)	<i>Trichoderma sp1</i>
Tige	Chaab rssas	01				(Saiah F, 2011)	<i>Cladosporium sp</i>
		02				(Chabasse ,2002)	<i>Penicillium sp 3</i>
		03				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 4</i>

Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique (Recto et verso)	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée
Tige	Ouled hamla	01				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 5</i>
		02				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 6</i>
Racine	Chaab rissas	01				(Chabasse ,2002)	<i>Fusarium sp 1</i>
		02				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 7</i>

Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée
Racine		03				(Annick ,2010)	<i>Fusarium sp 2</i>
	Chaab rssas	04				(Anofel ;2014)	<i>Aspergillus sp 8</i>
		05				(Anofel ;2014)	<i>Aspergillus sp 9</i>
		06				(Chabasse ,2002)	<i>Fusarium sp 3</i>

Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée	
Racine	Chaab rissas	07					(Chabasse, 2002)	<i>Chrysosporium sp</i>
		08					(Chabasse, 2002)	<i>Alternaria sp2</i>
	09					(Chabasse, 2002)	<i>Paecilomyces sp</i>	
	Ouled hamla	01					(Chabasse, 2002)	<i>Aspergillus sp 10</i>

Parties des plantes	Site de prélèvement	N° de souches	Observation macroscopique (Recto et verso)	Observation microscopique	Photo référence	références	Identification présumée
Racine	Ouled hamla	02				(Chabasse ,2002)	<i>Aspergillus sp 11</i>
		03				Forum.tt. hardware.com	<i>Penicillium sp4</i>
		04				(Hagop D, 2004)	<i>Penicillium sp 5</i>
		05				(Chabasse ,2002)	<i>Trichoderma sp2</i>

Les résultats obtenus montrent que les genres majoritaires sont *Penicillium sp*, *Aspergillus sp* et *Fusarium sp* avec des pourcentages supérieurs à 60 % en comparaison avec les genres *Alternaria sp*, *Trichoderma sp*, *Paecilomyces sp*, et *Cladosporium sp* et *Mucor sp* qui ont des pourcentages inférieurs à 40 %.

La comparaison des différents isolats obtenus à partir de la plante nous a permis de constater que les agents pathogènes sont transmissibles aux lentilles soit par le sol soit par l'air.

La différence dans la répartition des souches isolées entre les deux sites est justifiée par le fait que le site de Ouled Hamla est un site traité par des pesticides et celui des Chaab Rssas n'est pas traité vu qu'il est orienté pour études expérimentales.

4-2- Test d'antagonisme *In Vitro*

Après isolement et identification des souches fongiques obtenues par des plantes de lentille, on a procédé à des tests d'antagonisme en moyennant une souche *Trichoderma sp* élaborée par le Laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM).

Pour ce faire, quatre souches pathogènes ont été choisies pour deux types de test : la confrontation directe et la confrontation indirecte. Ces souches sont :

Aspergillus sp, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, et *Alternaria sp*

4-2 -1- Tests de confrontation directe

Les résultats que nous avons obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (pathogène –antagoniste).

Après 144 heures d'incubation à une température 25°C, une action inhibitrice exercée par *Trichoderma sp* vis-à-vis de la croissance mycélienne des isolats pathogènes testés a été observée.

Les souches pathogènes testées en présence d'antagoniste occupent des surfaces qui varient entre de 2.1 à 4 cm, ce qui correspond à une inhibition de croissance mycélienne supérieure à 40% suivie par un arrêt de croissance pour quelques souches pathogènes (*Aspergillus sp* et *Fusarium sp*).

Ces résultats sont en parfaite conformité avec ceux obtenus par Albouvette *et al* (1983) ; Dubot (1985) et Davet (1996) qui ont montré que la croissance de *Trichoderma sp* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs, c'est le phénomène appelé compétition. Ces résultats peuvent être aussi expliqués par le mécanisme d'antibiose, qui est due à la sécrétion de substances agissant comme étant des antibiotiques et qui inhibent aussi la croissance du pathogène.

La croissance de certaine souche (*Aspergillus sp* et *Pencillium sp*) est très lente dans le cas de confrontation directe, ceci est justifié par le fait que l'antagoniste montre une capacité d'arrêter à distance le développement du parasite avec formation d'une zone d'inhibition entre les colonies confrontées avec une largeur variable selon l'isolat.

Ces observations sont en accord avec les études précédemment réalisée par Haran *et al* (1996), Zhihe *et al* (1998) qui ont prouvé que *Trichoderma sp* produit des substances qui agissent comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance d'agents pathogènes.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre *Trichoderma sp* et l'agent pathogène montrent un enroulement du mycélium du *Trichoderma sp* sur celui du pathogènes (Tableau 06) .

Ces résultats sont similaires avec ceux d'Elad *et al.* (1983) qui à montrer que *Trichoderma sp* est l'un des champignons connus pour son mycoparasitisme par action parasitaire sur l'agent pathogène en enroulant son mycelium autour des hyphes du pathogène.

Ensuite, le mycoparasitisme pénètre dans les cellules du pathogène et consomme le contenu cytoplasmique.

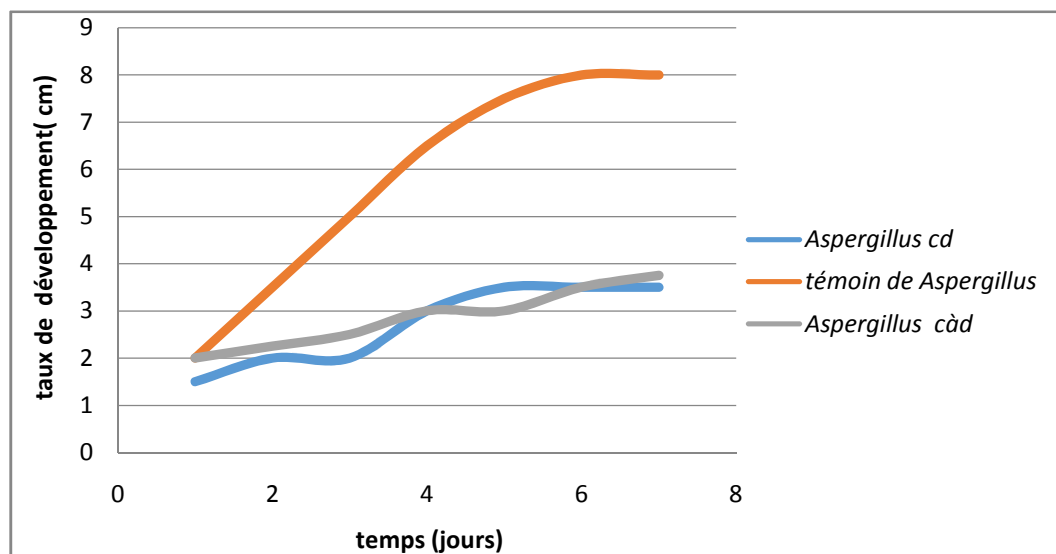


Figure 23 : Suivi de l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus sp* en présence de *Trichoderma sp*

cd : confrontation directe

càd : confrontation a distance

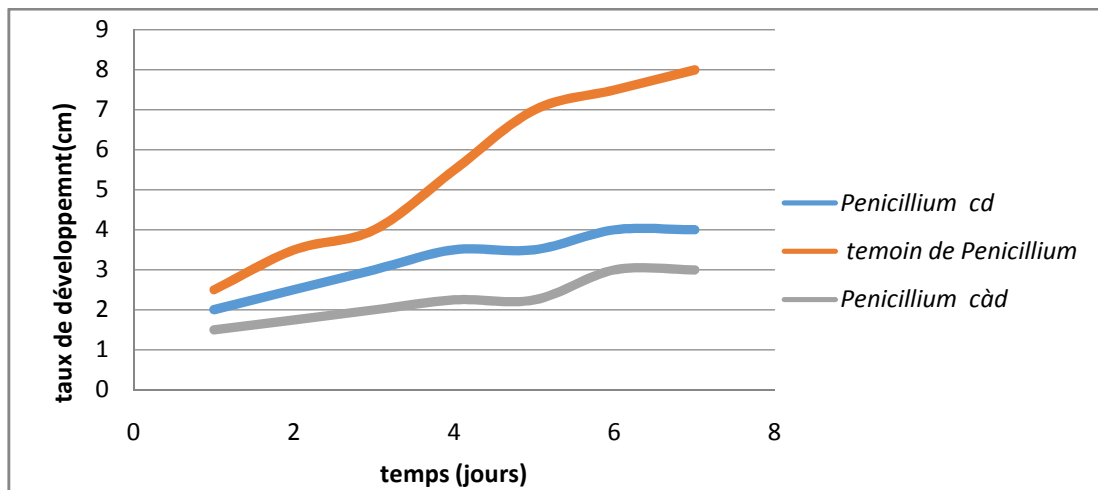


Figure 24 : Suivre de l'inhibition de la croissance de *Penicillium sp* en présence de *Trichoderma sp*.

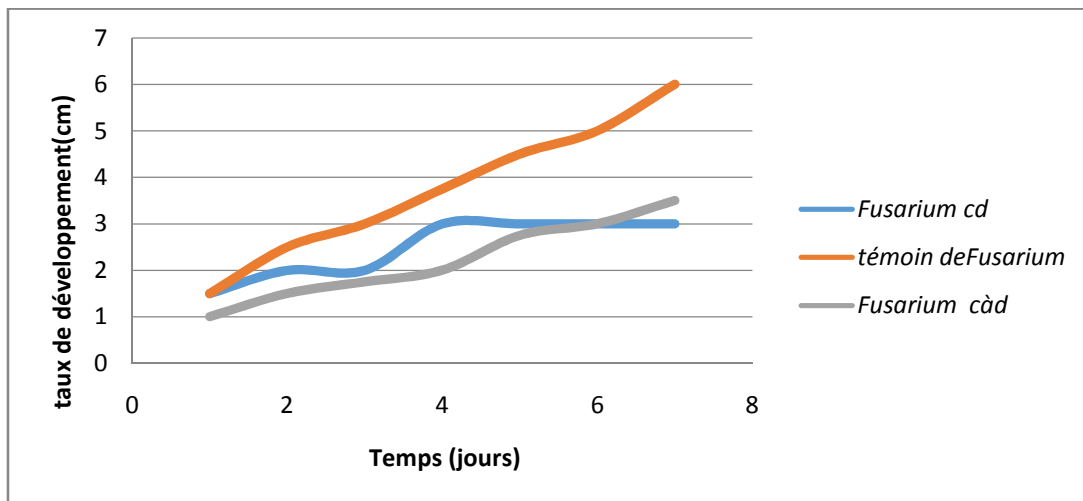


Figure 25 : Suivre de l'inhibition de la croissance d' *Fusarium sp* en présence de *Trichoderma sp*.

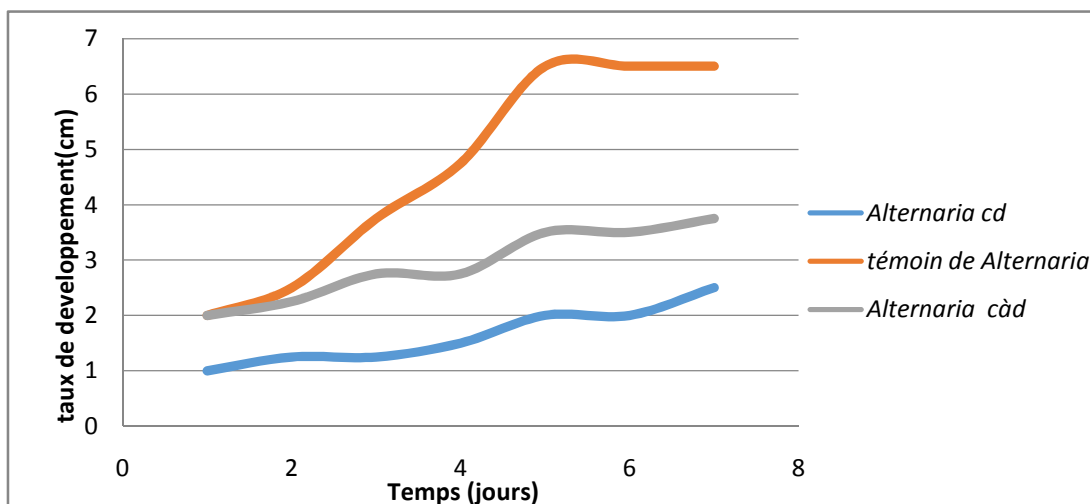


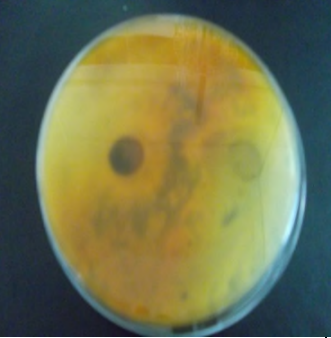

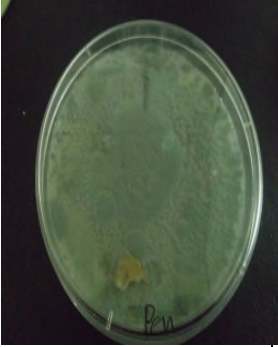






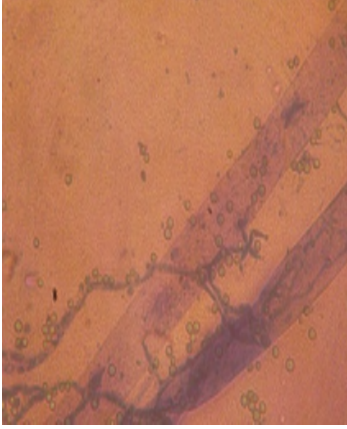



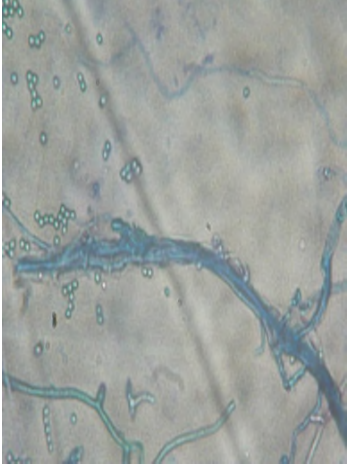


Figure 26 : Suivre de l'inhibition de la croissance d' *Alternaria sp* en présence de *Trichoderma sp*.

Tableau06 : Effet de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne des souches pathogènes (confrontation directe) après 7 jours d'incubation.

Souches pathogènes	Témoin	Résultats de test d'antagonisme macroscopique (recto et verso)	Résultats de test d'antagonisme microscopique	% Inhibition
<i>Aspergillus sp</i>		 		56.25%
<i>Penicillium sp</i>		 		50.1%

Souches pathogènes	Témoin	Résultats de test d'antagonisme macroscopique (recto et verso)	Résultats de test d'antagonisme microscopique	% inhibition
<i>Fusarium sp</i>		 		41%
<i>Alternaria sp</i>		 		61.53%

4-2 2- Tests de confrontation à distance

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de *Trichoderma sp* sur différents agents pathogènes testés.

Les résultats de ce test montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches pathogènes exercée par *Trichoderma sp* comparativement aux témoins.

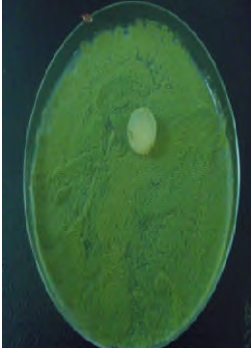
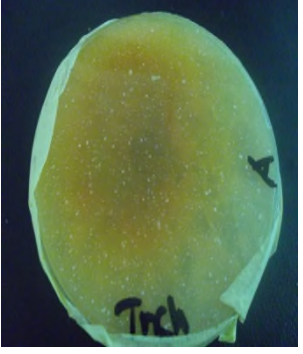
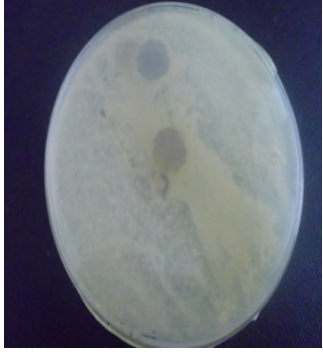
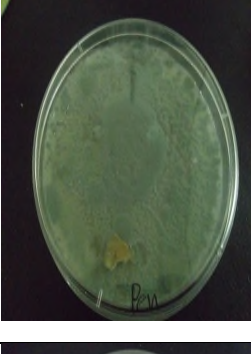




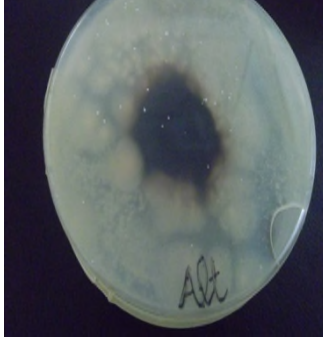

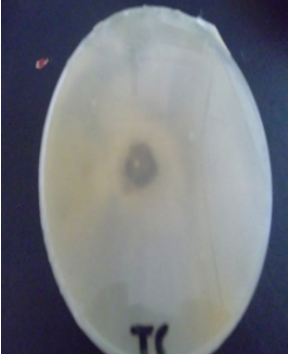

Contrairement au test de confrontation directe, on a remarqué que la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps.

Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre agents pathogènes et *Trichoderma sp* testés, ce dernier a pu exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies des isolats fongiques pathogènes.

Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies des pathogènes cultivé en présence et en absence de l'antagoniste (figure 23, 24, 25, 26).

En vue de ces résultats, nous pouvons expliquer l'inhibition par l'aptitude de *Trichoderma sp* à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène (Hibar *et al.*, 2005). D'après Meslouhi (1989) et Davet (1983) cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma sp* (phénomène d'antibiose) ; la capacité à produire de telles substances varie selon les isolats d'une même espèce ou d'espèce différente. Dennis et Websters (1971), ont montré aussi que les *Trichoderma sp* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous formes des substances volatiles importantes

Tableau 07 : Effets inhibiteurs de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne des agents pathogènes (confrontation à distance) après 7 jours incubation.

Souches pathogènes	Témoin	Résultats de Test d'antagonisme (face <i>Trichoderma sp</i>)	Résultats de Test d'antagonisme (face pathogène)	% Inhibition
<i>Aspergillus sp</i>				53.12%
<i>Penicillium sp</i>				62.5%
<i>Alternaria sp</i>				42.30%
<i>Fusarium sp</i>				41.66%

4- 3- Test *in vivo*

L'inoculation des plantes de lentilles avec l'agent pathogène provoque un flétrissement des plantes puis leur mort. La mortalité des plantes augmente avec le temps de culture.

Au 30^{ème} jour après inoculation, la plupart des plantes pulvérisées par les agents pathogènes sont mortes (Figure27).

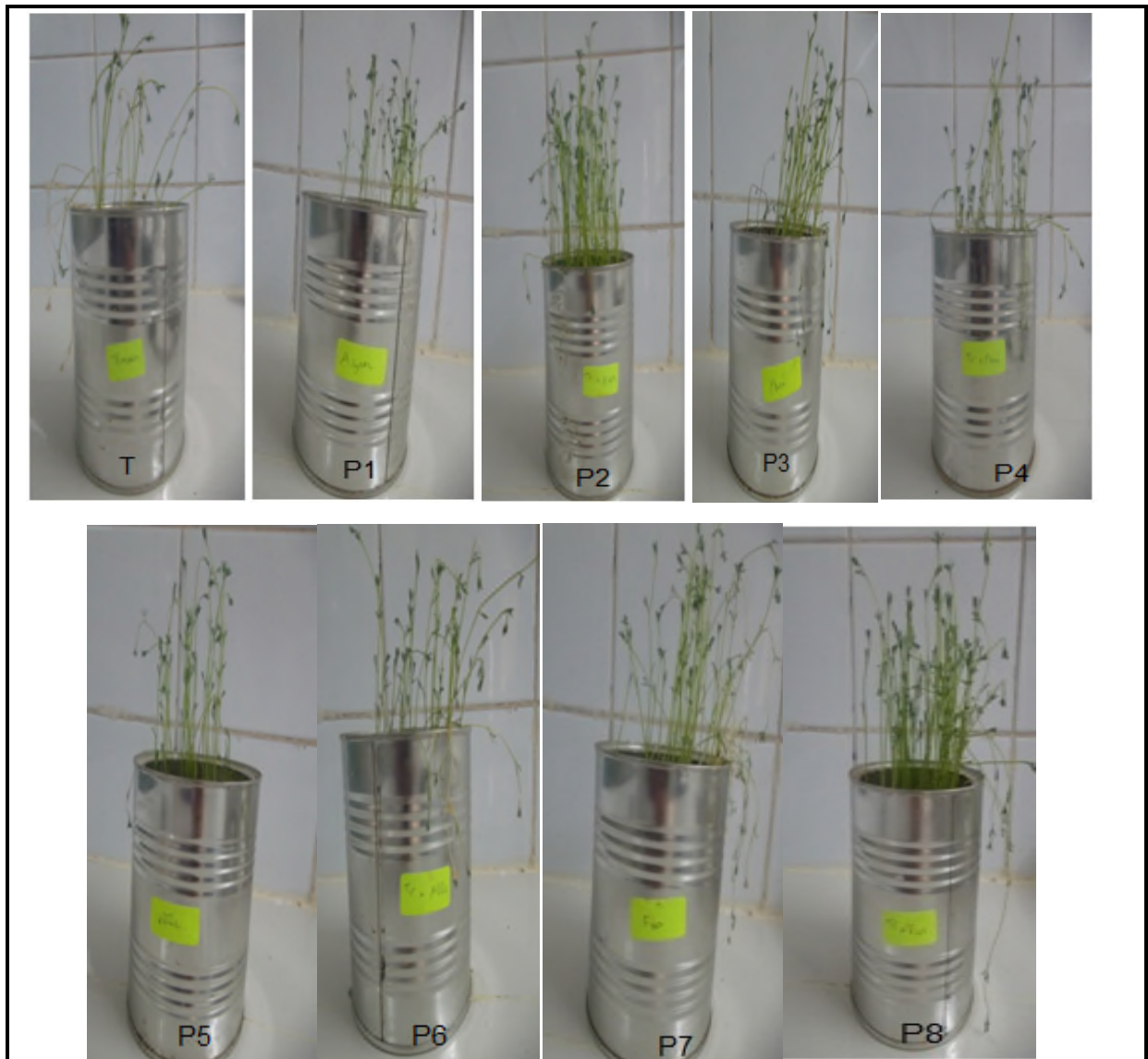


Figure27 : Effet de *Trichoderma* sp avec les agents pathogènes sur la croissance des plantes, après 30 jours d'inoculation.

T : Témoin, **P1** : *Aspergillus* sp, **P2** : *Aspergillus* sp+*Trichoderma* sp, **P3** : *Penicillium* sp, **P4** : *Penicillium* sp+*Trichoderma* sp, **P5** : *Alternaria* sp, **P6** : *Alternaria* sp+*Trichoderma* sp, **P7** : *Fusarium* sp, **P8** : *Fusarium* sp+*Trichoderma* sp.

La Co-inoculation de *Trichoderma sp* au niveau du même site d'infection que l'agent pathogène assure une protection totale des plantes durant 4 semaines car toutes les plantes restent saines comme les plantes témoins. Malgré l'inoculation de *Trichoderma sp* séparément de l'agent pathogène, il semble que cet antagoniste maintienne sa protection pour les plantes de lentille. Les résultats (figure 28) montrent que les plantes pulvérisées par *Trichoderma sp* sont moins exposés aux symptômes de maladies et mortalité par rapport au témoin et les plantes pulvérisées par l'agent pathogène.

L'efficacité de protection menée par *Trichoderma sp* diffère d'un agent à un autre, elle est plus efficace contre *Fusarium sp* (Essalmani H et Lahlou H ; 2003).

Une augmentation considérable de la taille des plantes a été aussi observée en fin du test *In Vivo*.

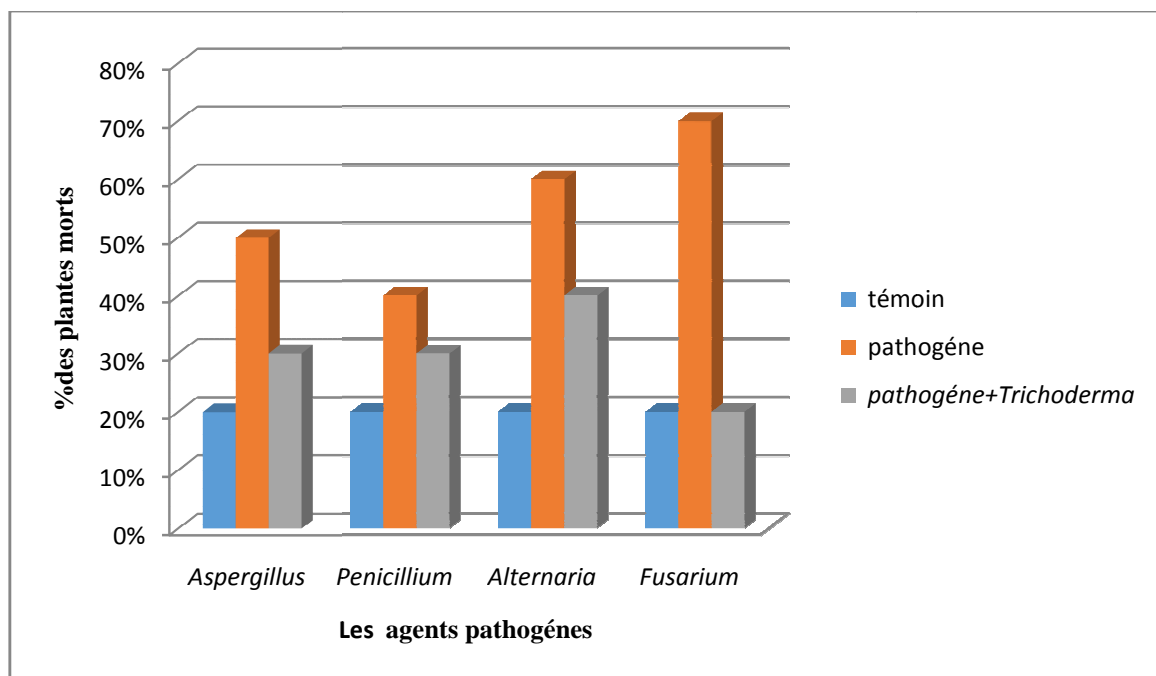


Figure 28 : pourcentage de plantes mortes dans le cas de la pulvérisation par l'agent pathogène et *Trichoderma sp* sur des plantes des lentilles comparativement aux témoins.

Dans des expériences réalisées *in vitro*, *Trichoderma sp* inhibe la croissance mycélienne avec un pourcentage supérieur à 40%. Les métabolites sécrétés par cette souche peuvent être des substances volatiles et/ou des antibiotiques.

Parmi les substances sécrétées par *Trichoderma sp* et qui ont une activité inhibitrice il y a des substances volatiles de types alkylespyrones (Claydon *et al*, 1987), acétaldehyde (Dennis et Webster, 1971) et des antibiotiques comme la trichodermine (Khasanov, 1962), lasuzukaciline, l'alaméthicine, la dermadine, la pénicilline, la trichotocine et la trichorzianine (Vial, 1989) qui provoquent un effet remarquable contre les pathogènes.

Les mécanismes mis en jeu par *Trichoderma in vivo* seraient les mêmes que ceux mis en évidence *in vitro*, à savoir le mycoparasitisme, la sécrétion des substances volatiles et diffusibles et la compétition pour l'espace et les nutriments (Benhamou *et al*, 1996).

Altomare *et al* (1999) ont démontré que les *Trichoderma sp* stimulaient l'augmentation de la croissance des plantes par rapport à un témoin non traité. Essalmani (2004) suggère que la bioprotection de la lentille contre la Fusariose par le moyen de *Trichoderma sp* est basée aussi bien sur l'antibiose que sur l'induction de la résistance.

Les résultats démontrent qu'un agent de lutte biologique *Trichoderma sp* ne peut être très efficace contre tous les agents pathogènes d'une culture (Dennis et Webster ,1971). Selon Besselat. (1985), Lanusse *et al.* (1983) Domsch (1993) *Trichoderma sp* antagoniste et Mycoparasite seulement les espèces suivantes :

Alternaria, *Armillariamellea*, *Atheliarolfsii colltotrichumlini*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Helminthosporum sp*, *Actinomucorelegans*, *Atheliarolfsii*, *Cachliobolussativus*, , *Lentinusedodes*, *Mucor plumbeus*, *M.hiemalis*, *Phaeolusschweinitzii* *Phytophthora parasitica* *Phytophthora citrophthora*, *Pythium sp*, *Phycomycesnitens* .

5-Conclusion

5-Conclusion

Le travail présenté de cette étude a consisté à étudier des maladies fongiques des lentilles (*Lens culinaris*) et de mettre en évidence l'effet de l'agent antagoniste *Trichoderma sp* sur quelques souches pathogènes isolées à partir des différentes parties de cette plante.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude ont révélés la présence de 28 souches fongiques appartenant à 9 genres, classés dans les deux grandes familles Zygomycotina et Deutromycotina et ceci à partir de 2 régions d'études : Chaab Rssas (Constantine) et Ouled Hamla (Oum-EL-Bouaghi).

Les tests d'antagonismes *in vitro* menés contre 4 souches pathogènes de lentille ont donné des résultats positifs par les deux méthodes testées (confrontation directe et indirecte) en moyennant *Trichoderma sp* comme souche antagoniste. Cette souche a totalement inhibé la croissance des champignons pathogènes par l'enroulement de ces hyphes autour des filaments de ces derniers, suivie par une lyse du mycélium du pathogène grâce à la production d'enzyme.

De leur part, les tests d'antagonismes *in vivo* par les 4 agents pathogènes testés sur les plantes de lentilles Aboutissons à la conclusion que des phénomènes d'antagonisme mesurés *in vitro* correspondent à une réalité au niveau de maladie sur la plante.

Au terme de cette étude, il serait peut-être intéressant de fixer les perspectives suivantes:

- Approfondir l'étude sur les conditions de contaminations des plantes.
- Étendre l'expérimentation *in vivo* de la souche *Trichoderma sp* avec d'autres espèces phytopathogènes sur des plantes économiquement importantes à notre pays.
- Établir des sociétés nationales spécifiques de production des biofongicides à base de *Trichoderma sp* et autres microorganismes antagonistes dans l'objectif protégé les cultures des légumineuses alimentaires en Algérie.

Résumé

La recherche des moisissures pathogènes dans les plantes *Lens culinaris* dans les deux zones d'étude : Chaab Rssas (Constantine) et Ouled Hamla (Oum EL Bouaghi) a révélé la présence de 28 souches appartenant à 09 genres (*Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Trichoderma sp*, *Paecilomyces sp* et *Cladosporium sp*, *Chrysosporium sp*) descendant de deux familles Zygomycotina et Deutromycotina. Ce genre capable d'infecter importe quelle partie de cette plante constituant ainsi une menace pour la culture.

L'approche de lutte biologique par essais d'antagonismes *in vitro* (confrontation directe et indirecte) ont donné des résultats positifs avec les 4 genres testés : *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*. Au moyen d'utilisation du champignon *Trichoderma sp*.

Le test d'antagonismes *in vivo* avec les mêmes genres testés *in vitro* ont donné des résultats encourageants (positifs) a révélé efficacement du champignon *Trichoderma sp* contre les 4 agents pathogènes testés. Ces résultats suggèrent que l'antagoniste protège les plantes par les différents modes d'action de *Trichoderma sp* (antibiose, parasitisme, compétition).

Mots clés : *Lens culinaris*, *Trichoderma sp*, Lutte biologique, Antagonisme *in vitro*, Antagonisme *in vivo*

Summary

The research of the pathogenic fungi in the plants *Lens culinaris* in zone study:

Chaab Rssas (Constantine) and Ouled Hamla (Oum EL Bouaghi) a revealed the presence of 28 apartments type strains descendant to 09 genera (*Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Trichoderma sp*, *Paecilomyces sp* et *Cladosporium sp*, *Chrysosporium sp*, *Mucor sp*) descendant of two families *Zycomicotina* and *Deutromycotina*. these genera able to infect imports which part of this plant thus constituting a threat for the culture.

The approach of biological control by tests of antagonisms *in vitro* (direct confrontation and indirect) one give positive results with the 4 tested: *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp* By means of use of the fungi *Trichoderma sp*.

The test antagonisms *in vivo* with the same genera tested *in vitro* have give encouraging results (positive) revealed fungus *Trichoderma sp* against effectively the 4 genera pathogenic agents tested. These results suggest that the antagonist *Trichoderma sp* protects the plants by deferent the action mode from *Trichoderma sp* (antibiosis, parasitism, competition).

Key words: *Lens culinaris*, *Trichoderma sp*, Biological control, Antagonisms *in vitro*,
Antagonisms *in vivo*

الملخص :

أسفر البحث عن الفطريات الممرضة لنبات العدس في كلتا مناطق الدراسة شعب الرصاص (قسنطينة) و أولاد حملة (أم البواقي) إلى الحصول على 28 فطر تابعة إلى 9 أجناس:

sp,Trichoderma sp, sp,Alternaria sp, Fusarium Aspergillus sp, Penicillium Chrysosporium sp sp, sp,cladosporium ,Mucor sp et Paecilomyces

هذه الأجناس تنتمي إلى عائلتي : *Zycomicotina, Deutromycotina*

هذه الفطريات قادرة على إصابة الأجزاء المختلفة لنبات العدس مما يشكل تهديدا لزراعته.

إن المكافحة البيولوجية تعتمد أساسا على استعمال طريقة المواجهة المباشرة وغير المباشرة و التي أعطت نتائج ايجابية باستعمال فطر: *Trichoderma sp* مع أربعة أجناس المجربة :

Alternaria sp, Penicillium sp, Aspergillus sp, Fusarium sp

إن دراسة التضاد على نبات العدس مع نفس الأجناس المجربة سابقا أدى إلى الحصول أيضا على نتائج مشجعة

وايجابية . و عليه فان هذه النتائج بينت أن الفطر المضاد يحمي نبات العدس بمختلف أشكال عمل فطر

Trichoderma (تنافس, تضاد حيوي, تطفل)

الكلمات المفتاحية : المكافحة البيولوجية , العدس , فطر *Trichoderma*, اختبارات التضاد.

 Annexe
1- Composition de milieux de culture

PDA : milieu d'extrait de pommes de terre, de dextrose et d'agar

Ingrédients :

Pommes de terre	200	g
Agar	20	g
Dextrose	20	g
Eau distillée	1000	mL

1. Laver et peser les pommes de terre, puis couper-les en petits morceaux.

2. Faites-les bouillir, jusqu'à ce qu'elles soient tendres.

3. Retirez les pommes de terre et écrasées les.

4. Ajoutez de l'eau au bouillon jusqu'à l'obtention d' 1 litre exactement.

5. Ajoutez de Dextrose et l'agar.

Veillez à mettre la quantité exacte de sucre et d'agar pour éviter que la préparation soit trop dure.

6. Remuez de temps et chauffez jusqu'à ce que l'agar ait fondu (Ronald, 1997).

Czapek DOX

- NaNO ₃	1	g
- KCl	0,5	g
- MgSO ₄ H ₂	0,5	g
- KH ₂ PO ₄	1	g
- FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,001	g
- Saccharose	30	g
- agar	20	g
- eau distillée	1000	ml
- Ph : 6		

Milieu sabouraud -chloramphénicol

Peptone	10	g
Glucose	20	g
Agar	20	g
Chloramphénicol	0,5	g
Eau distillée	1000	mL
pH : 5 - 5,6		

Milieu de conservation

Pommes de terre	50 g
Glycerol	75 mL
D- Glucose	5 g
Eau distillée	250 mL

MEA (Malt Extract Agar) :

- Extrait de Malt	20 g
- Glucose	5 g
- Agar	15 g
- Eau distillée	1000 ml
- Ph : 5	

2- Colorant des milieux de culture**Bleu au lactophénole**

Phénol cristallisé pur	10 g
Acide lactique	10 g
Glycérine	20 g
Bleu coton C4B (ou bleu de Méthyle)	0,25 g
Eau distillée	10 mL (CHABASSE et <i>al.</i> , 2002).

3-Préparation du sable stérile

- criblage de sable.
- Lavage 3 fois par l'eau normale pour éliminer le sol et la boue.
- En suit en fait 2^{ème} lavage par HCl à concentrations 0.03% pour élimine le sel minéraux.
- Après 24h En laver 3fois par l'eau distillée pour éliminer la trace d' HCl et laisser sécher.
- En fin en passe le sable dans autoclave pour stérilisation a température 120°C pendant 3h.

Références Bibliographiques

- 1-Adam A**, 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège Belgique, 165p.
- 2- Ahmed, I.; Bissett, J. & Malloch, D.** Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma* species and its implications for their control of phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1995, 53 : 49-59
- 3-Ait Abdallah et al** ,2011.Culture et cout de production des grandes cultures. P 84. ISBN : 978-9961-881-18-7.
- 4-Ajouz, S.** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* a de biofongicides. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse : Faculté des Sciences, 2009.
- 5-Alabouvette, C ; Couteaudieur, Y et Lotjvert , J** ,1983. Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16. XXIV. Colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).
- 6-Anonyme 01:** <http://www.jardinons-alecole.org/pages/ideel8.php> , .
- 7-Anonyme 02:** <http://www.ndsu.edu/pubweb/pulseinfo/images/lentil>.
- 8-Anonyme 03:** <http://www.imep-cnrs.com/licence/planches%20tp%20myco%202.pdf>
- 9-Anonyme 04:** http://www.biophytech.fr/documents/Mode_action_Humesca.pps
- 10-Anonyme 05:** <http://www.maplandia.com/algeria/constantine/>
- 11-Anonyme06:**<http://www.maplandia.com/algeria/Oum-El-Bouaghi/>
- 12- Arumuganathan, K., Earle E, 1991.** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol*, p 208-218 .
- 13-Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (Anofel), 2014.** Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes.
- 14-Bayaa, B; Erakine, W; Khoury, L.** 1986. Survey of wilt damage on lentil in North West syria. *Arab JPL prot* ; 4 :119 -4.
- 15-Bejiga, G**, 2006. *Lens culinaris* Medik. Fiche de Protabase. Brink, M. & Belay, G. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas.

- 16- Benhamou, N., Chet, L,** 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzi*man: Ultra structural and cytochemical aspects of the interaction. - *Phytopathology*, 86(4), 405-416.
- 17- Benkada ,M** .Evaluation du risque fongique en zones conchyliques : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse de doctorat, Chimie biologie, Université de Nantes : faculté des sciences pharmaceutiques, 2006.
- 18-Botton, B** et al , 1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson,Paris.
- 19- Buchwaldt, L** (2004) .Identification of lentil germplasm resistant to *Colletotricum truncatum* and characterisation of two pathogen races. *Phytopathology* 94, 236-243.
- 20- Cahagianier, B et Richard –Molard , D.** 1998 Analyse mycologique in moisissures des aliments peu hydratés, éd.TecandDoc,p140-158.
- 21-Camporta ,P** , 1985. Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani*Kuhn. *Agronomie* 5(7) : 613-620.
- 22- Caron , J** .phytopathologiste Horti-Protection inc. 2002. Conférence Présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémile5décembre.
- 23-Caron,J.**Décembre 2002. Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.
- 24-Chabasse , D ; Bouchara , J –P ; Degentdl , L** et al Mars 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Paris : bioforma éd.230 bd Rspail 75014 Paris. Cahier de formation N= °25 biologie médicale.
- 25-Champion,R.**1997. Identifier les champignons transmis par les semences. [en ligne] éd : INRA. Chapitre 8, Les champignons transmis par les semences, p. 104 et 303. ISBN : 2-7380-0702-3. [réf. Du 13 Mai 2012]. Disponible sur internet : http://books.google.pn/books?id^yQ2xj5D9VgC&+les+champignons+transmis+par+les+semences&W=fr&ei=zXz2TeXQMNO8A06taipBw&sa=X&oi=book_result&ct=book-previewlink&resnu=l&ved^CCsQuwUwAA#v=^nepage&q&f==false
- 26- Chen, W., Sharma, H.C., Muehlbauer, F.J.,** 2011. Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- 27-Chouaki , S** ,2006. Deuxième rapport national sur l'état des ressources Phytogénétiques. INRAA. p19-20.
- 28- Claydon et al** (1987).Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the britishmycological society* 88: 505-513.

- 29- Cokkizigin, A,** et al 2013. Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization and Advances in Transformation Agricultural. Published by Science and Education Centre of North America. volume 1. ISSN 2291-448X.
- 30-Corbaz, R.** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des Plantes [en ligne]. 1ère éd. Suisse, 1990 [consulté le 16 Mars 2011]. Disponible sur le web : <books.google.com.pa/.../Principes de phytopathologie et de lutte.html>. ISBN 2-88074-201-3.
- 31- Davet , P .** 1983. Les *Trichoderma*, exemple de champignon antagoniste d'agents pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture, pp. 193-204. ACTA, INRA- ENSAM Montpellier (FR).
- 32- Davet, P.,** 1983. Introduction et conservation de *Trichoderma* dans le sol. Les antagonistes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes, pp. 159-168. ACTA, INRA- ENSAM- Montpellier (FR).
- 33- Davet, P.** 1986. Activité parasitaire des *Trichoderma* vis-à-vis des champignons à sclérotés; corrélation avec l'aptitude à la compétition dans un sol non stérile. Agronomie 6 (9):863-867.
- 34- Denis, C et Webster, I., 1971.** « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. Trans. Br. Mycol. Soc. 57, 41-48.
- 35- Douaci –Khalfi, A,** 2011. Les maladies fongiques du pois chiche et de la lentille. ITGC. p :2-8.
- 36- Elad , Y; Chet, I; BOYLE, P** et al. parasitism of *Trichoderma spp.* on rhizoctonia solani and sclerotium rolfsii. scanning electron microscopy and fluorescens microscopy. *phytopathology* ,1983.73:85-88
- 37-Essalmani, H et Lahlou ,H,** 2003. Induction, par *Trichoderma harzianum*, de la résistance des plantes de lentille contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. VOL 24.P :51-58.
- 38- Essalmani , H.,** 2004. Contribution à la lutte biologique contre la fusariose vasculaire (*Fusariumoxysporum f.sp. lentis*) de la lentille au Maroc. *Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mohamed V, 156p.*
- 39- Fachverlag , H. C ,**2001. Analytica Microbiologica. European Brewery Convention.
- 40- Gary ,J,** et al . *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. *Mycological Progress* [en ligne]. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USD A, 2011 [consulté le 12 Mai 2011]. Disponible sur le web : <http://mvcologv.umd.edu/Trichoderma.html>. ISSN:1617-416X.

- 41-Goodwin , M,2005.** Profil de la culture de la lentille au Canada. Centre pour la lutte antiparasitaire Programme de réduction des risques liés aux pesticides Agriculture et Agroalimentaire Canada960, avenue Carling, immeuble 57 Ottawa (Ontario) K1A 0C6 CANADA.
- 42- Guiraud J.P.** (1998). *Microbiologie alimentaires*, (edn) dunod .Paris.
- 43-Harana , S. ; Scinckler, H. ; Chet, I.** 1996. Molecular mechanism of lyticenzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Micrbiology*142 :2312-2331.
- 44- Hawthorne W et al ;2011 .** grain legume : the magazine of the European association for grain legume research. CSIC, Institute for Sustainable Agriculture, Córdoba, Spain. P60. ISSN 0245-4710.
- 45- 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, p. 697–705.
- 46- Ignoffo, C.M.** 1970. Proceedings of the Tall Timbers Conférence of Ecology of Animal Contributions by Habitat Management, Tallahassee, Florida. Tall Timbers Research Station : 47-57
- 47-Ignoffo, CM.** 1973. Effects of Entomopathogens on Vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*,217: 141 -165.
- 48- ITGC.**2011.la lentille et le pois chiche pour une conduite mécanisée.P27. . Disponible sur leweb :www.itgc.dz.
- 49 -ITGC,**2013. Culture de lentille. Disponible sur le web : www.itgc.dz.
- 50- Kaiser, W-J et al** (1998), First report of anthracnose of lentil incited by *Colletotrichum truncatum* in Bulgaria. *Plant Disease* 82, 128.
- 51- Khasanov, O -K,** (1962) The antibiotic properties of fungiof the genus *Trichoderma* Pers, found in the swamp soil of Usbekistan. *Usbekshell Biologichesll Zhmnal, Tashkend* 6: 62-67.
- 52- Kubicek et al ,** 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biology*, 38 (3) : 310-319
- 53-Lefort, F ,**2010. Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. Institut Terre Nature Paysage et Filière Agronomie, Hepia HES-SO//Genève.p :57.

- 54-Leyral , G.; Joffin , J-N.** 1998. Microbiologie technique 2^{ème} éd. Bordeaux CRDP, ISBN 2-86617-334-1. P285-297. Chapitre 9. Champignons.
- 55-Maslouhi A., 1989.** Contribution à l'étude in vitro des antagonistes de *Fusarium oxysporum* *F. sp Albedinis*, agent causal du Bayoud, pp 4-8. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc)
- 56 - Messiaen , C M ; Lafon R. 1970.** Les maladie des plantes maraichère 2^{ème} éd. Paris: INRA. Chapitre1;détermination des maladies, p. 9-31.
- 57-Muehlbauer , F. J., Slinkard , A. E. and Wilson , V. E.** 1980. Lentils. Pages 417-426 in Hybridization of crop plants. Amer. Soc. Agron., Madison WI.
- 58-Nasseraoui, B.** 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées, chapitre 4 p367-447.
- 59-Nasseraoui, B.** Les champignons parasites des plantes cultivées, 2006.chapitre 3 p320-347.
- 60- Papavizas, G.C;** 1985. Trichoderma and Gliocladium: Biology, ecology and Potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol23:p23-54.
- 61-Rouaissi M et al ,2008.**Identification morphologique et moléculaire d'espèces du genre *Trichoderma* isolées de différents sols Tunisiens. Microbiol. Hyg. Alim.-Vol 20, N° 57
- 61-Roussos , Sevastianos.** Croissance de *trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de doctorat. ORSTOM,Paris,France,1985.
- 62-Saiah ,F et al ,2011.** Isolement de champignons entomopathogènes à partir de *Phyllocnistis citrella*Stainton.P :199-202.
- 63- Samson R.A., Hoekstra E.S. and Van Oorschot C.A.N.** 1981 Introduction to food borne fungi,(edn)C.B.S,Amsterdam.
- 64- Sandgreg , M. ; Stahlberg , J. & Mitchinson , C.** Structural and biochemical studies of GH family12cellulases:improvedthermalstability,andligand complexes.Prog.Biophys.Mol.Bio.,2005,89:246-291.
- 65-Sayoud, R et al, 1999.**les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb, guide pratique.64p. ITGC, Alger.
- 66-Schwartz et Langham, 2012** .grows stage of lentil. Disponible sur internet : <http://legume.ipmpipe.org>.
- 67- Street , K et al 2008.** Directives pour la régénération: lentille. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 10 pp.

68-SY (A.A.). 1976. Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Recherche In vitro d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique Thèse Doct. Ingénieur INPToulouse,n°534,236p.www.sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASH8e42/a871ae70.dir/doc.pdf.

69-Tvoli ,B ;Gaubel ,G. les légumineuses alimentaires méditerranée. contrainte biotique et potentialité de développement. France :INRA,1997.collection88 .

70-Vial , L (1989) Critères de qualité de la production d'un biopesticide à base de *Trichoderma harzianum*RIFAI. Mémoire, École Nationale d'Ingénieurs des travaux agricoles, Bordeaux, France

71-Vining,L.C. Functions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol., 1990, 44 : 395-427.

72-Vizcaino, J.A.; Sanz , L. ; Cardoza , R.E. ; Monte , E. &Gutierrez , S. 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., 2005, 244 : 139–148.

73-Voet,D. et Voet , J.G. Biochimie. Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, 1998, pp. 56-69, 1360 p.

74-Wenger, G. 2004 .la vogue des légumineuses et autre légumes a cosse. Séminaire professionnelle de la fédération de producteur suisse de lait PSL pour les enseignants en économie familiale.

75- Wilson, V. E. and Law , A. G. 1972. Natural crossing in *Lens esculenta* Moench. J. Am. Soc. Hort. Sci. 97:142-143.

76-Zhihe , C. ; Qingping , W; Mlfflong , X. et al. 1998 Advance of biocontrol of *Trichoderma* and *Gliocladhan*. J. Microbiol, 25(5): 284-286

NOM : Kabouche Prénom: Mouatez billah	Hamrouche. Abdeldjallil.	Date de soutenance : 26/06/2014
Thème Evaluation de l'effet de <i>Trichoderma sp</i> vis-à-vis de quelques pathogènes des lentilles (<i>Lens culinaris</i>)		
<p>Résumé</p> <p>La recherche des moisissures pathogènes dans les plantes <i>Lens culinaris</i> dans les deux zone étude : Chaab Rssas (constantine) et Ouled Hamla (Oum- EL- Bouaghi)a révélé la présence de 28 souches appartenant à 09 genre (<i>Aspergillus sp, Penicillium sp, Fusarium sp, Alternaria sp, Trichoderma sp, Paecilomyces sp</i> et <i>Cladosporium sp, Chrysosporium sp</i>) descendant de deux familles <i>Zycomicotina et Deutromycotina</i>. Ce genre capable d'infecter importe quelle partie de cette plante constituant ainsi une menace pour la culture.</p> <p>L'approche de lutte biologique par essais d'antagonismes <i>in vitro</i> (confrontation direct et indirect) ont donnees des résultats positifs avec les 4 genres testés :</p> <p><i>Alternaria sp, Penicillium sp, Aspergillus sp, Fusarium sp</i> Au moyen d'utilisation du champignon <i>Trichoderma sp</i>.</p> <p>Le test antagonisme <i>in vivo</i> avec les mêmes genres testés <i>in vitro</i> ont donnees des résultats encourageants (positifs) a révélé efficacement du champignon <i>Trichoderma sp</i> Contre les 4 agents pathogènes testés. Ces résultats suggèrent que l'antagoniste <i>Trichoderma sp</i> protège les plantes par les déférents modes action de <i>Trichoderma sp</i> (antibiose, parasitisme, compétition).</p>		
<p>Mots clés : <i>Lens culinaris, Trichoderma sp</i>, lutte biologique, antagonisme <i>in vitro</i>, antagonisme <i>in vivo</i>.</p>		
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM).</p>		
Encadreur : Mr. DEHIMAT L. Président du jury : Mr .KACEM CHAUOCHE N. Examineur : M ^{elle} LAHLAH		Pr. Université Mentouri Constantine. Pr. Université Mentouri Constantine. M.A. Université Mentouri Constantine.