



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie fongique

Intitulé :

Contribution à la lutte biologique contre quelques champignons pathogènes isolés à partir du *Triticum durum* (variété CIRTA) par *Trichoderma harzianum* dans la région de Constantine.

Présenté et soutenu par : Bouledjmar Ahlem

Le : 24/06/2017

Dendane Amina

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. DEHIMAT L. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Encadreur : Dr ALMI H. MCB. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Examineurs : Mme ABDELAZIZ O. MAA. Université des Frères Mentouri Constantine 1

**Année universitaire
2017 - 2018**

Remerciements



Nous remercions avant tout "ALLAH" tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

*Nous tenons à exprimer toute notre gratitude, notre reconnaissance et nos sincères remerciements à Dr: **Almi Hiba**, l'encadreur de notre mémoire, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et de nous avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury Mr. Le professeur **Dehimat L.** doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Melle **Abdelaziz O.** qui nous font le grand honneur d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de notre profonde reconnaissance.*

*BOULEDJMAR AHLEM
Dendane Amina*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mon père que dieu le bénisse.

*Ma mère qui m'onttant donné et qui ont tendrement veillé à moi de
puisque j'étais petite.*

*J'espère qu'un jour je pourrais leur rendre un peut de ce qu'elle est fait
pour moi.*

*Je dédie aussi ce travail a Ma chér frère: **Mohamed**;*

*A mes chères sœurs: **Sarah, Sabrina, Manel et Youssra**;*

*Mon binôme **Amína***

A tous mes amis

A tous mes collègues

Qui m'ont encouragée moralement.

Ahlem



Dédicace

Je dédie avec joie et fierté ce travail à mon cher père "Dendane Ibrahim " pour sa tendresse et sa patience.

À ma chère mère "Amrani Zahra" qui s'est tant battue pour mon bien être, pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus difficiles épreuves.

A ma chère sœur: Zeineb ;

A mes chers frères: Boubakeur, Salah et Khalil ;

Mon binôme Ahlem

A tous mes amis et mes collègues de promotion des mycètes

Amina



Table de matières

- **Dédicaces**
- **Remerciements**
- **Liste des figures**
- **Liste des tableaux**
- **Liste des abréviations**

INTRODUCTION.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le blé	4
1.1. Généralité sur le blé.....	4
1.2. Morphologie de la plante	4
1.3. Cycle biologique.....	5
1.3.1. Période végétative.....	5
1.3.2. Période reproductrice	6
1.4. Exigences du blé.....	8
1.4.1. Le sol.....	8
1.4.2. L'eau.....	8
1.4.3. Températures.....	8
1.5. Importance économique du blé.....	9
1.5.1. Dans le monde.....	9
1.5.2. En Algérie.....	10
2. Les maladies Fongiques de Blé.....	10
2.1. La Fusariose.....	11
2.2. L'helminthosporiose (Tan Spot).....	12
2.3. Septoriose.....	12
2.4. Les rouilles	13
3. Lutte biologique par l'utilisation de <i>Trichoderma harzianum</i>	13
3.1. Généralités.....	13
3.2. L'espèce <i>Trichoderma harzianum</i>	14
3.2.1. Morphologie.....	14
3.2.2. Taxonomie.....	15
3.2.3. Reproduction	16

3.2.4. Mode d'action.....	16
3.2.5. Les métabolites de <i>Trichoderma harzianum</i>	17

MATERIEL ET METHODE

1. Présentation de la zone d'échantillonnage	19
2. Matériel	20
2.1. Matériel biologique.....	20
2.1.1. Souche Antagoniste.....	20
2.1.2. Souches pathogènes.....	20
2.2. Milieux de culture.....	20
2.2.1. Milieu d'isolement.....	21
2.2.2. Milieu de purification.....	21
2.2.3. Milieu de fermentation.....	21
3. Méthodologie.....	22
3.1. Méthode d'isolement.....	22
3.2. Méthode de purification	22
3.3. Méthode d'identification.....	23
3.3.1. Identification macroscopique	23
3.3.2. Identification microscopique.....	23
3.4. Méthode de conservation	23
4. Les Tests d'antagonismes	24
4.1. Méthode de confrontation directe.....	24
4.2. Méthode de confrontation indirecte.....	25
4.3. Test d'activité antifongique par des métabolites secondaires de <i>Trichoderma harzianum</i>	26
5. Mise en évidence l'activité enzymatique de la souche antagoniste.....	26
5.1. L'activité protéolytique	27
5.2. L'activité cellulosique.....	28
5.3. L'activité lipolytique.....	27
5.4. L'activité pectinolytique	27

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des souches fongiques isolées.....	28
1.1. Identification macroscopique.....	28
1.2. Identification microscopique.....	35
2. Etude statistique.....	47
3. Les tests d'antagonismes.....	48
3.1. Test de confrontation directe.....	48
3.2. Test de confrontation indirect.....	49
3.3. Test d'activité antifongique par les métabolites secondaire de <i>T.harzianum</i>	51
4. Mise en évidence l'activité enzymatique de la souche antagoniste	53
4.1. L'activité protéolytique	53
4.2. L'activité cellulolytique.....	53
4.3. L'activité lipolitique.....	54
4.4. L'activité pectinolytique.....	55

CONCLUSION.....56

- **Résumé**
- **Abstract**
- **Annexe**
- **Référence bibliographique**

Liste des abréviations

F.A.O: *Food and Agricultural Organization.*

g/l : gramme par litre.

ha: hectare.

I.N.R.A.A: Institut National de la Recherche Agricole Algérie.

kg: kilogramme.

m: mètre.

ml: millilitre.

mm: millimètre.

min: minute.

N°: numéro.

O.A.I.C: Office Algérien Interprofessionnel des Céréales.

PDA: *Potato Dextrose Agar.*

pH: potentiel d'hydrogène.

sp: espèce.

v/v: volume par volume.

%: pourcentage.

Liste des figures

Figure 01 : Morphologie de l'épi et de la fleur de blé (Mosiniak et al., 2006).....	5
Figure 02 : Cycle végétal du blé selon (Fritas, 2012).....	7
Figure 03 : Production et superficie occupées par les principales céréales dans le monde en 2010 (Jacquemin, 2012).....	9
Figure 04 : Production de blé en Algérie en tonnes de 1961 à 2011 (FAO, 2016).....	10
Figure 05 : Symptômes de la Fusariose de blé (A) Plantes de blé infecté par la fusariose ; (B) Fusariose à la base de la tige.....	11
Figure 06 : Symptômes de L'helminthosporiose du blé.....	12
Figure 07 : Symptômes de la septoriose du blé.....	13
Figure 08 : Symptômes de la rouille jaune du blé.....	13
Figure 09: Aspect microscopique (A) et macroscopique (B) de <i>Trichoderma harzianum</i>	14
Figure 10: Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma harzianum</i> (Samuels et al., 1994)	15
Figure11 : Localité de site d'isolement: El khroub	20
Figure 12 : Méthode d'isolement à partir des fragments de plantes du Blé dur	22
Figure 13 : Présentation schématique de la confrontation directe.....	24
Figure 14 : Présentation schématique de la confrontation indirect	25

Figure 15 : Pourcentages des différents genres fongiques obtenus à partir d'échantillons du blé dur de la région d'El Khroub.....	47
Figure 16 : Test de l'activité protéolytique de <i>T. harzianum</i>	53
Figure 17 : Test de l'activité cellulolytique de <i>T. harzianum</i>	54
Figure 18 : test de l'activité lipase de <i>T.harzianum</i>	54
Figure 19 : test de l'activité pectinolytique de <i>T.harzianum</i>	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Les principales maladies fongiques du blé (Sayoud et al., 1999).....	10
Tableau 02 : Classification de <i>Trichoderma harzianum</i> (Bissett, 2004).....	15
Tableau 03 : Caractères macroscopiques des souches isolées des grains de blé dur...28	
Tableau 04 : Caractères microscopiques des souches isolées de différentes plantes du Blé dur.....	36
Tableau 05 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches pathogènes par <i>T.harzianum</i> : cas de confrontation directe.....	49
Tableau 06 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches pathogènes par <i>T.harzianum</i> : cas de confrontation indirecte.....	50
Tableau 07 : Diamètres de lyses des souches pathogènes par <i>T. harzianum</i>	52

INTRODUCTION

Les céréales ont une grande importance et occupent une place prépondérante dans la production mondiale qui est de l'ordre de tonnes environ 02 milliards de tonnes (**Pastre et Roa, 1993 ; Multon, 1982 ; Apperit, 1985**), elles représentent dans les pays pauvres environ 75% des calories nécessaires.

Parmi les céréales, Le blé est l'une des premières plantes introduites en culture, en raison de ces nombreuses qualités favorables en alimentation humaine (**Buyser, 2001**).

En 2017, selon la F.A.O, la production mondiale du blé s'établira à 744,5 millions de tonnes. Ce volume présente un recul de 1,8 % par rapport à l'année précédente (2016) mais reste supérieur à la moyenne des cinq dernières années (**Espoir Olodo, 2017**).

Actuellement, l'Algérie est un grand importateur de blé et se trouve dépendante du marché international. Cette situation risque de se prolonger à plusieurs années, faute de rendements insuffisants et des besoins de consommation sans cesse croissants devant une forte évolution démographique (**Chellali, 2007**).

Au cours du cycle de production du blé, de nombreuses maladies peuvent survenir (surtout les cryptogamiques qui présentent 90% des maladies affectant les végétaux) (**Charlotte, 2017**). Ces maladies, peuvent causer des pertes importantes dans le rendement allant jusqu'à 50%, lorsque les variétés utilisées sont sensibles et les conditions environnementaux sont favorables (**Tizioualou, 2009**).

Selon l'O.A.I.C de la région EST d'Algérie, des observations sur le terrain ont confirmées que pas moins de 10 000 Hectares des cultures céréalières à Mila et Constantine, sont susceptibles d'être affectées par des maladies cryptogamiques (**Mechti, 2014**). La prolifération de moisissures provoque non seulement des modifications physiques (aspect, goût, odeur...) et aussi chimiques (qualités nutritives), mais peut donner lieu aussi à la formation des mycotoxines. Ces derniers, entraînent à l'échelle mondiale des pertes estimées de 5 à 10 % des céréales et leurs dérivés (**Bouafia et Touati, 2013**).

Actuellement, devant l'évolution démographique et le progrès de la technologie alimentaire, il est devenu très utile de maximiser la production alimentaire afin d'assurer une alimentation adéquate pour la population mondiale.

Pour ce faire, il est devenu très utiles de réduire la présence des espèces pathogènes qui sont en compétition alimentaire avec la plante.

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les

moisissures nuisibles (**Magan *et al.*, 2004**). Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telles que la faune auxiliaire et l'apparition des microorganismes résistants.

Actuellement, il est devenu très indispensable de rechercher des molécules nouvelles en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers un essai de la lutte biologique par l'utilisation de souches fongiques antagonistes pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques.

Dans cette optique, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se dirige vers " Isolement de quelques mycètes pathogènes de Blé dur (variété CIRTA) et la mise en évidence de l'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum*".

Notre travail est donc scindé en trois parties :

- La première portera donc sur une synthèse bibliographique rassemblant les différentes connaissances relatives à notre plante modèle (Blé dur), les principales maladies fongiques. Et finalement des éclaircissements sur l'antagoniste *Trichoderma harzianum*.
- La deuxième partie est consacrée au travail expérimental, réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM); Biopole Campus Chaab El Rassas, Université des frères Mentouri ; Constantine 1. Cette partie a abordé les points suivants :
 - ✓ Isolement des agents pathogènes, à partir des espèces végétales infectées (Blé dur Var. CIRTA).

- ✓ Purification des agents pathogènes.
- ✓ Identification et caractérisation, macroscopique et microscopique des isolats pathogènes.
- ✓ Conservation des souches prélevées.
- ✓ Tests d'antagonistes (confrontation direct, confrontation indirect, activité antifongique, activité enzymatique).
- La troisième partie présente les différents résultats obtenus suivis par des interprétations et discussions et enfin, une conclusion.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le Blé

1.1. Généralité sur le blé

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (**Slama et al., 2005**). Parmi ces céréales, le blé occupe la première place dans la production mondiale et la deuxième après le riz, comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15% de ses besoins énergétiques (**Bajji, 1999**). Le blé est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climats arides et semi-arides là où l'agriculture est dans la plus mauvaise passe.

D'un point de vue production, le blé est estimé à 660 millions de tonnes, l'équivalent de 100 kg par habitant on considèrerait la population mondiale. D'après (**Mahfoud et Lasbahani, 2015**), les deux espèces du Blé les plus cultivées sont :

- ✓ Le blé dur (*Triticum durum*).
- ✓ Le blé tendre (*Triticum aestivum*).

1.2. Morphologie de la plante

Le blé est une monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* famille des *Gramineae*. C'est une plante herbacée annuelle, de hauteur pouvant atteindre 1,70 m (**Botarela, 2012**). Le grain est un fruit sec et indéhiscant, appelé caryopse (**Feillet, 2000**).

La plante de blé comprend différentes parties qui sont :

- Les racines : les racines du blé sont fibreuses. A la germination les radicules ou racines primaires est un entre-nœud sub-coronal émergent de la graine. Le système racinaire secondaire peut être assez développé, s'enfonçant à des profondeurs atteignant jusqu'à deux mètres (**Soltner, 1988**).
- Les tiges et Feuilles : les tiges sont des chaumes, cylindriques, souvent creuses par résorption de la moelle centrale. Les chaumes sont interrompus par des nœuds qui sont une succession de zones d'où émerge une longue feuille, qui

engaine d'abord la tige puis s'allonge en un limbe étroit à nervures parallèles. La feuille terminale a un rôle primordial dans la reproduction (**Soltner, 1988**).

- L'inflorescence : c'est un épi, celui-ci est formé de deux rangées d'épillets situés de part et d'autre de l'axe (Figure 01). Un épillet regroupe trois fleurs à l'intérieur de deux glumes. Chaque fleur est dépourvue de pétales et est entourée de deux glumelles. Elle contient trois étamines, un ovaire surmonté de deux styles plumeux. À la suite de l'autofécondation (cléistogamie) il y a formation d'un fruit indéhiscent, le caryopse (**CNRS, 2011**).

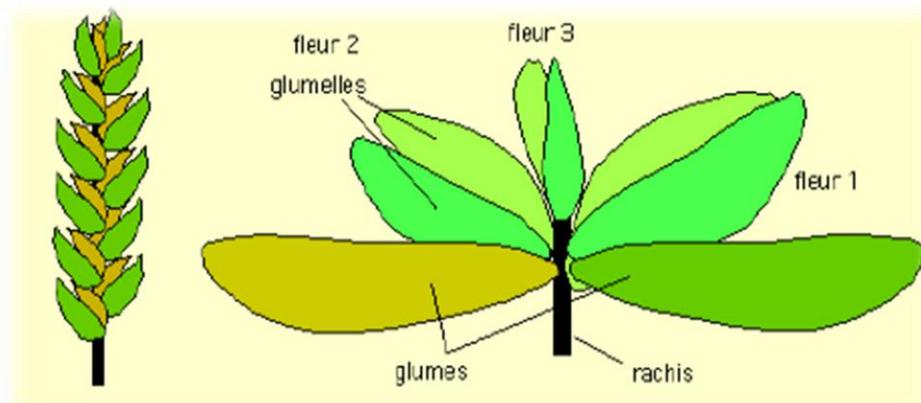


Figure 01 : Morphologie de l'épi et de la fleur de blé (**Mosiniak et al., 2006**).

1.3. Cycle biologique

Durant le cycle annuel du blé (Figure 02), une succession d'étapes s'effectue, ces dernières sont : période végétatif et période reproductrice (**Zeitoune, 2011**).

1.3.1. Période végétative

Elle se caractérise par un développement strictement herbacé et s'étend du semis jusqu'à la fin du tallage, elle se divise en deux phases :

- Phase germination – levée : si les conditions sont requises (température, humidité, etc.), le grain de blé va germer. Quelques jours plus tard apparaissent

la première manifestation importante de la jeune plante en développement, une sorte d'acte de naissance : l'épointement de la radicule (la jeune racine déjà présente dans l'embryon) (**Claire, 2013**).

La germination de la graine se caractérise par l'émergence de la coléorhize donnant naissance à des racines séminales et de la coléoptile qui protège la sortie de la première feuille fonctionnelle. La levée se fait réellement dès la sortie des feuilles à la surface du sol.

- Phase levée – tallage : la production de talle commence à l'issue du développement de la troisième feuille. Du stade trois feuilles (épi = 1 cm), ce sont des tiges latérale appelée talle qui sont des « épis potentielles ». Au même niveau de la base de la tige il se formera une touffe herbacée et commencera alors la période dite de « montaison » (**Anonyme, 2005**).

La fin du tallage représente la fin de la période végétative, elle marque le début de la phase reproductive, conditionnée par la photopériode et la vernalisation qui autorisent l'élongation des entre-nœuds.

1.3.2. Période reproductrice

Cette phase est subdivisée en trois sous-phases :

- Phase montaison – gonflement : durant cette phase, les tiges s'allongent et les feuilles supérieures sortent ; ce qui nécessite de gros besoins en eau et en azote. Pour tous ces éléments, et pour la lumière, il y a compétition entre les tiges : les plus faibles meurent. Les racines ne progressent plus en profondeur mais se ramifient (**Alliès et al., 2004**). La montaison s'achève à la fin de l'émission de la dernière feuille et des manifestations du gonflement que provoquent les épis dans la gaine.
- Phase épiaison – floraison : cette phase correspond à l'épiaison (apparition des épis à l'extérieur), puis à la fécondation (ouverture des sacs polliniques), à la germination du pollen et à la fécondation de l'ovule. Cependant, la floraison consiste en l'éclatement des anthères qui libèrent le pollen ; les filets qui les portent s'allongent, cette opération entraîne à travers les glumelles entrouvertes,

les sacs polliniques desséchés, à l'extérieur flotte alors tout autour de l'épi comme de petites fleurs blanches c'est l'ensemble de ces petites fleurs qui laissent dire que « l'épi est fleuri » (**Hennouni, 2012**).

- Phase de maturation du grain : la phase de maturation succède au stade pâteux (45% d'humidité). Elle correspond à la phase au cours de laquelle le grain va perdre progressivement son humidité en passant par divers stades (**Nadjem, 2012**). Elle débute à la fin du palier hydrique marqué par la stabilité de la teneur en eau du grain pendant 10 à 15 jours. Au-delà de cette période, le grain ne perdra que l'excès d'eau qu'il contient et passera progressivement au stade rayable à l'angle (20% d'humidité) puis, stade cassant sous la dent (15-16% d'humidité) (**Hennouni, 2012**).

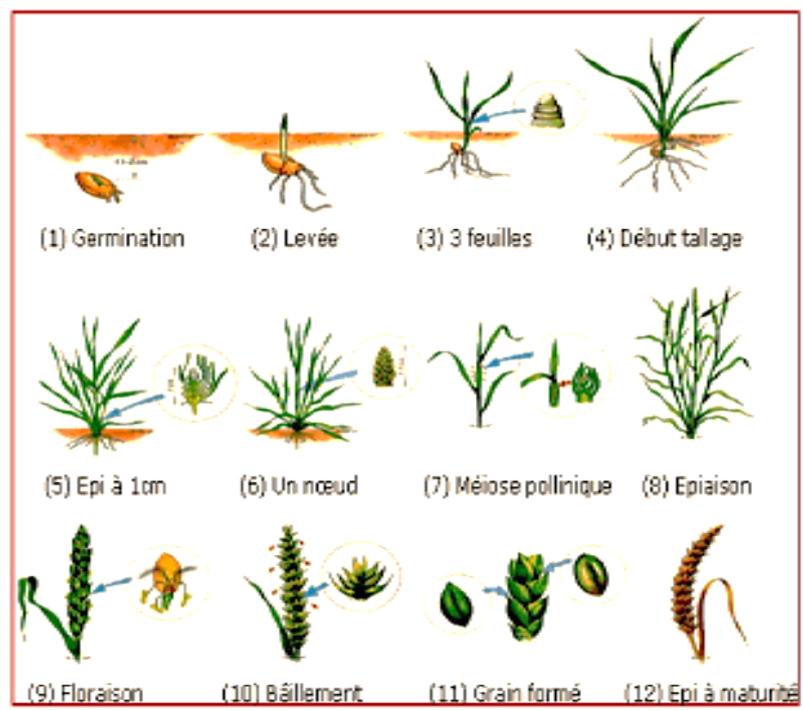


Figure 02 : Cycle végétal du blé selon (Fritas, 2012).

1.4. Exigences du blé

1.4.1. Le sol

L'alimentation hydrique d'une plante ou d'un couvert végétal est gouvernée par les relations sol plante fondées sur les caractéristiques du sol et des plantes (**Olioso, 2006**).

Le blé est une plante qui se développe dans les meilleures conditions dans des soles à texture limono-argileuse fine stable constituant d'une richesse suffisante en colloïdes et nécessitent une bonne profondeur (**Chellali, 2007**).

1.4.2. L'eau

L'eau est un facteur de l'environnement qui influence la quasi-totalité des réactions physiologiques des végétaux. (**Duthil, 1973 ; Catell, 2006**).

Les blés ont besoin de 550 mm d'eau en moyenne au cours de leur cycle de développement. De la montaison jusqu'à floraison, ces besoins sont considérables jusqu'à 180mm (**Moule, 1980**).

En effet, au début du cycle végétatif la sécheresse affecte l'installation de la culture, alors qu'au milieu du cycle végétatif, elle affecte principalement la fertilité des organes reproducteurs de la plante (**Gate, 1995**).

1.4.3. Températures

Le froid, la sécheresse et les fortes températures limitent la croissance et le développement des différentes composantes du rendement au cours des phases végétatives (**Evans et Wardlaw, 1976**). La température est la caractéristique environnementale qui contrôle le développement de la plante, elle conditionne à tout moment la physiologie du blé. Une température supérieure à 0°C est exigée pour la germination, le gel printanier affecte la formation de l'épi (**Bouzerzour, 1998 ; Tahir et al., 1998**).

1.5. Importance économique du blé

1.5.1. Dans le monde

Les céréales, le blé en particulier occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35% de la production mondiale (Hamel, 2010). Le blé arrive juste derrière le riz et le maïs si l'on considère les tonnages produits (Figure 03) (Jacquemin, 2012) avec une production mondiale estimée à 650,9 millions de tonnes en 2009 (Zahri et al., 2014).

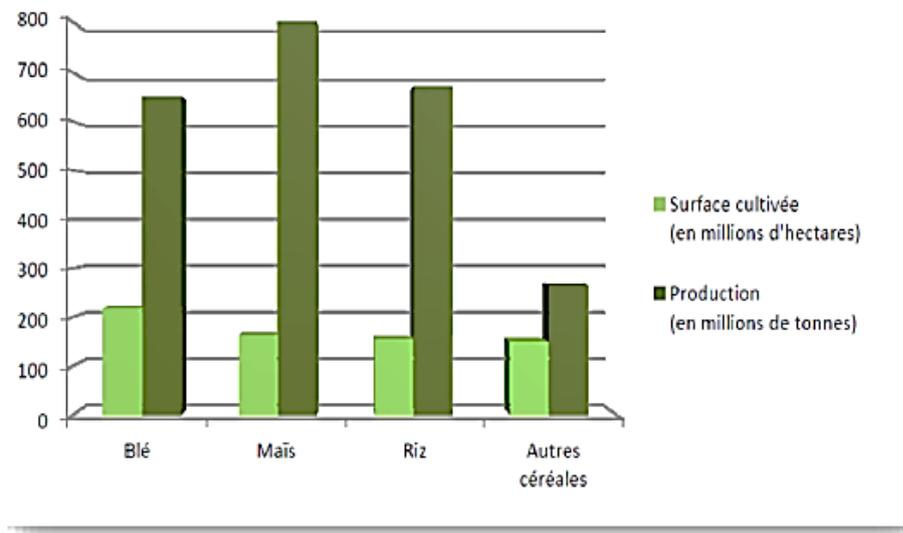


Figure 03: Production et superficie occupées par les principales céréales dans le monde en 2010 (Jacquemin, 2012).

En Méditerranée, la France est la première productrice de blé. Elle a enregistré les plus hauts rendements, pour le blé avec 7 tonnes/ha. Des améliorations de rendements ont été obtenues un peu partout en Méditerranée et en Arabie Saoudite. Les superficies céréalières sont en légère régression, les plus importantes emblavures céréalières sont celles de la Turquie avec 14 millions d'hectares, de la France avec 8,8 millions d'hectares, de l'Espagne avec 6,7 millions d'hectares et enfin le Maroc avec 6 millions d'hectares (Fritas, 2012).

1.5.2. En Algérie

L'Algérie est une grande importatrice de blé et se trouve dépendant du marché international (Figure 04). Cette situation risque de se prolonger à plusieurs années, faute des rendements insuffisants et des besoins de consommation sans cesse croissants devant une forte évolution démographique (Chellali, 2007).

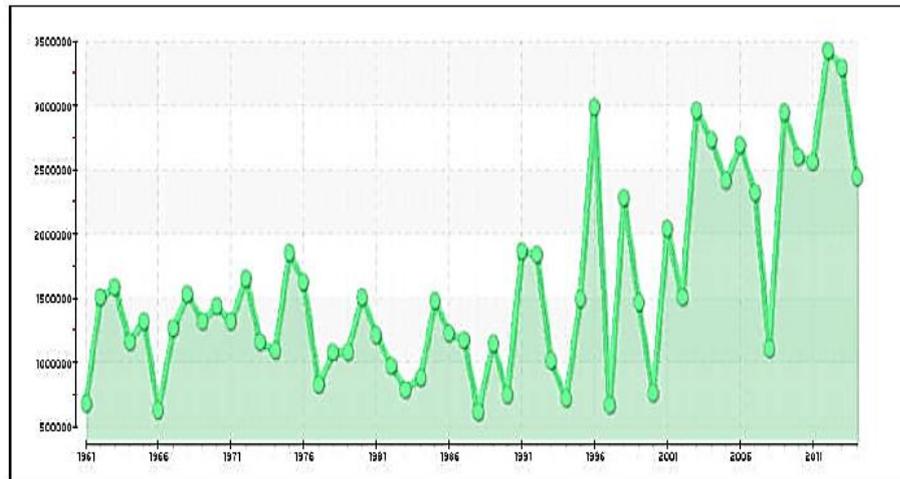


Figure 04 : Production de blé en Algérie en tonnes de 1961 à 2011 (F.A.O, 2016)

2. Les maladies Fongiques du Blé

Les maladies (Tableau 01) qui s'attaquent au blé sont dues à plusieurs types de pathogènes à savoir les champignons, bactéries, virus, nématodes. Les principales maladies fongiques répandues dans le monde et en Algérie sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Sayoud et al., 1999).

Tableau 01 : Les principales maladies fongiques du blé (Sayoud et al., 1999).

Maladie	Agent causal
Rouille jaune	<i>Puccinia striiformis</i>
Rouille noire	<i>Puccinia graminisf.sp.tritici</i>
Rouille brune	<i>Puccinia triticina</i>
Oïdium	<i>Erysiphegraminisf.sp.tritici</i>
Tache helminthosporienne	<i>Pyrenophoratrutici-repentis</i>
Caries	<i>Tilletia caries et Tilletiafoetida</i>

Charbon foliaire	<i>Urocystisagropy</i>
Charbon nu	<i>Ustilagotritici</i>
Pourriture racinaire	<i>Cochliobolussativus</i> <i>Fusariumculmorum</i> <i>Fusariumgraminearum</i> <i>Fusariumavenaceum</i>
Septoriose	<i>Septorianodorum</i> ou <i>Stagnosporanodorum</i> <i>Septoriatritici</i> ou <i>Mycosphaerellagraminico</i>

2.1. La Fusariose

Il existe de nombreuses espèces du genre *Fusarium* qui affectent les céréales. Ces champignons forment un complexe de maladies qui infectent les grains, et les plants adultes. Généralement, l'agent pathogène transmis par les semences, *Microdochium nivale* (autrefois appelé *Fusarium nivale*) est également inclus dans ce groupe de champignons. *M. nivale* est le principal agent pathogène du groupe ; il provoque la fonte des semis, qui entraîne la mort des pousses et un éclaircissage. D'autres espèces causent une série de symptômes, notamment des lésions brunes à la base des tiges (**Clement, 1981**).

Les lésions (Figure 05) causées par la fusariose apparaissent souvent à la base de la tige, dans la gaine des feuilles que les racines coronales déchirent lors de leur sortie. Cette infection peut ensuite s'étendre à la gaine de la feuille, une propagation qui se manifeste par la présence de longues stries brunes à la base de la tige (**Feillet, 2000**).

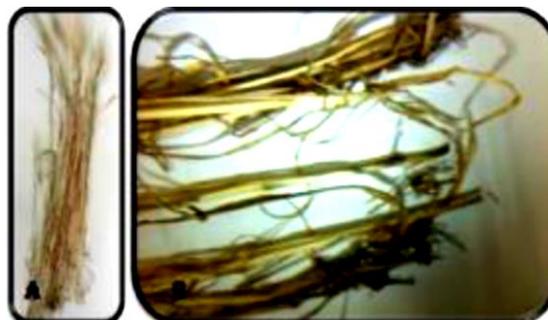


Figure 05 : Symptômes de la Fusariose de blé ; (A) : Plantes de blé infecté par la fusariose ; (B) : Fusariose à la base de la tige.

L'infection entraîne souvent le blanchiment de tout ou partie de l'épi. Ce symptôme est observé lorsque les épis sont infectés aux premiers stades de floraison. Les infections plus tardives peuvent provoquer l'infection des grains, sans blanchiment notable des épis. La phase de blanchiment des épis de cette maladie du blé peut provoquer une perte de rendement, mais la principale préoccupation est la production potentielle de mycotoxines dans les grains.

2.2. L'helminthosporiose (Tan Spot)

Le Tan spot est largement distribué dans les régions productrices de blé. Les attaques sont importantes plus particulièrement au nord du pays. Les pertes de rendement causées par cette maladie sont importantes et peuvent atteindre 30% (Eliard, 1979).

Les symptômes (Figure 06) causés par *Pyrenophora tritici-repentis* (*Drechslera tritici-repentis*), se présentent sous forme de taches uniformément brun foncé, 2 à 10 mm de longueur et pouvant être bordées d'un halo jaune. Les taches peuvent s'allonger et être délimitées par les nervures mais les lésions n'auront jamais l'apparence de longues stries étroites comme la rayure réticulée (Gate, 1995).

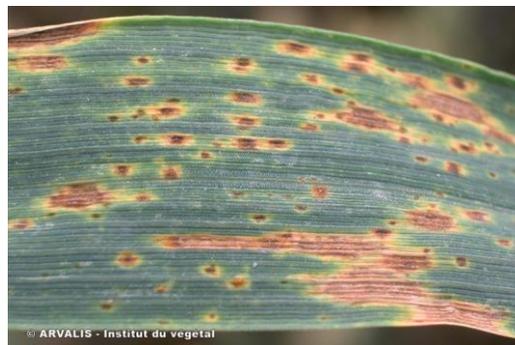


Figure 06 : Symptômes de L'helminthosporiose de blé.

2.3. Septoriose

La tache septorienne déterminée sont causée par une moisissure dit *Septorianodorum* (Figure 07). Les symptômes se manifestent sur le feuillage et sur les glumes, la gaine des feuilles et les nœuds. Sur les feuilles, on peut observer des taches ovales ou lenticulaires brunes, elles peuvent être entourées d'une chlorose ou d'un jaunissement périphérique.



Figure 07 : Symptômes de la Septoriose du blé.

2.4. Les rouilles

Ils sont causés par les espèces du genre *Puccinia*, se caractérisant par petites pustules circulaires ou ovales de couleur variant selon le type de rouille (urédospores), apparaissent sur la face supérieure des feuilles (Lamari et al., 1991 ; Sayoudet al., 1999 ; Ezzahiri, 2001) et parfois sur la face inférieure des feuilles (Figure 08).



Figure 08 : Symptômes de la rouille jaune de blé

3. Lutte biologique par l'utilisation de *Trichoderma harzianum*

3.1. Généralités

La lutte biologique, consiste à utiliser des organismes vivants, appelés auxiliaires, ou de leurs produits, pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des bio agresseurs. Il s'agit d'utiliser la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles (Fernandes, 2005). La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de bio contrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action (Cook, 1993 ; Benbrook et al., 1996) et à la capacité de l'agent de lutte biologique a colon XWisé et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes

(Singh et al., 2003). Parmi les champignons, le genre *Trichoderma* forme un important groupe d'antagonistes.

3.2. L'espèce *Trichoderma harzianum*

3.2.1. Morphologie

Depuis la révision du genre *Trichoderma* par (Rifai, 1969), les caractéristiques morphologiques sont utilisées pour caractériser et distinguer les espèces de *Trichoderma* (Gams et Bissett, 2002). En outre, (Samuels et al., 2015) ont également fourni des observations détaillées sur les caractères morphologiques des espèces définies de *Trichoderma*.

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* est apprécié à partir de cultures sur géloses appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes (Figure 09). Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

T.harzianum peut être distingué des espèces morphologiquement similaires, tels que *T. aggressivum* et *T. atroviride* en les cultivant à 35 °C. Après 96 heures d'incubation à 35 °C, le diamètre des colonies de *T. aggressivum* et *T. atroviride* ne dépasse pas les 5 mm, tandis que celui de *T. harzianum* présente une bonne croissance et sporulation (Samuels, 2004).

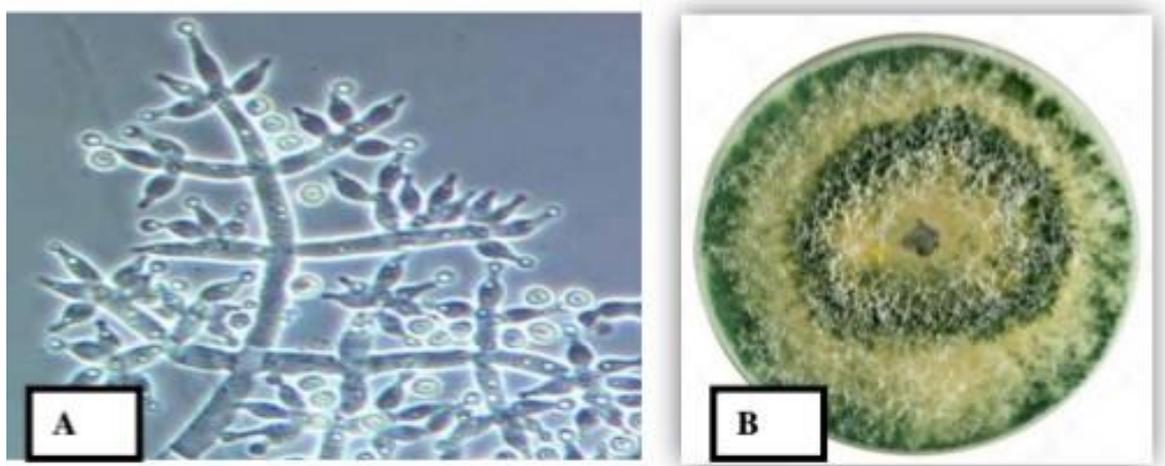


Figure 09: Aspect microscopique (A) et macroscopique (B) de *Trichoderma harzianum*

D'un point de vue microscopique le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Figure 10) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. À leur tour, les phialides portent les spores.

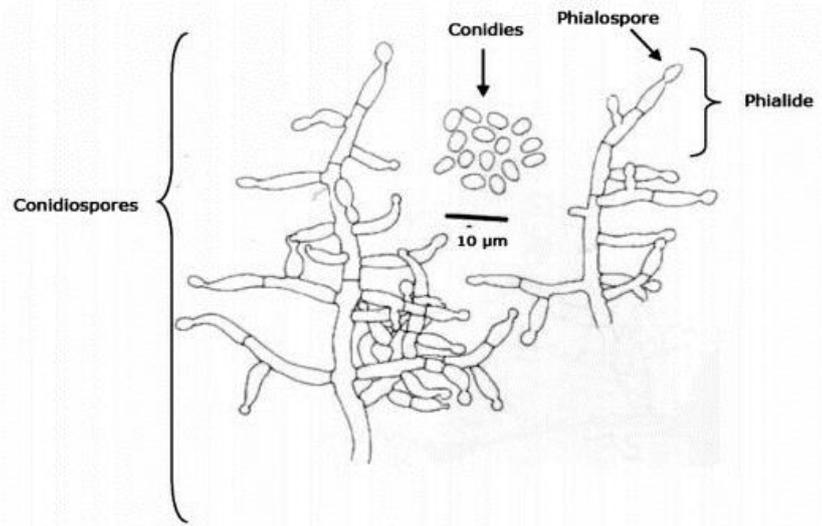


Figure 10: Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma harzianum* (Samuels et al., 1994).

3.2.2. Taxonomie

Les travaux de (Rifai, 1969) et les techniques de la biologie moléculaire, basées sur le polymorphisme des séquences de l'ADN ont pu révéler une classification phylogénique pour le genre de *Trichoderma*.

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma harzianum* se présente comme suit :

Tableau 02 : Classification de *Trichoderma harzianum* (Bissett, 2004)

Règne	Fungi
Embranchement	<i>Amastigomycota</i> et/ou <i>Eumycetes</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Sous division	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Hypocraceae</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>

3.2.3. Reproduction

Trichoderma harzianum est un champignon asexué. Les conidiospores représentent la phase dominante de la multiplication. Dans des conditions appropriées, les spores germent, donnent un mycélium, constituent des hyphes ramifiées, nouveaux conidiospores sont formés dans des phialides. (Rifai., 2004).

3.2.4. Mode d'action

Trichoderma harzianum fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la protection des plantes vis-à-vis des maladies parasitaires. Il est capable d'attaquer différents agents pathogènes par des mécanismes variés dont les principaux sont le parasitisme, l'antibiose et la compétition (Howell, 2003 ; Vinale et al., 2007). Ces mécanismes sont utilisés de manière complexe, indépendamment ou en synergie, suivant l'adversaire et les conditions du milieu (Suty, 2010).

- Le mycoparasitisme : le parasitisme des champignons phyto-pathogènes par les *Trichoderma* est un phénomène complexe. Ce phénomène résulte d'un enroulement de *Trichoderma* autour du pathogène soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent.
- L'antibiose : l'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu chez les espèces de *Trichoderma* qui repose sur la production de métabolites secondaires de nature diverse, exerçant un effet inhibiteur voire létal sur l'agent pathogène (Vinale et al., 2007).
- La compétition: la compétition pour les éléments nutritifs et l'espace est un des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique des agents phyto-pathogènes (Tronsmo et Hjeljord, 1998). Au niveau de la rhizosphère, la compétition pour l'espace est intense et s'exprime par la colonisation de la surface racinaire (Sivan et Chet, 1989). *Trichoderma* est parmi les microorganismes rhizosphériques les plus compétitifs qui pourront tirer profit de l'apport nutritif libéré par le système racinaire et tenter de coloniser la racine des plantes. La pénétration de *Trichoderma* au niveau du tissu racinaire est généralement limitée

au niveau de la première couche ou bien la couche secondaire des cellules racinaires (Yedidia et al., 1999, 2000; Metcalf et al., 2001). La reconnaissance entre la plante et *Trichoderma* aboutit à la synthèse des phyto-alexines (molécules fongi-toxiques) (Howell, 2003 ; Shores et al., 2005). (Yedidia et al., 2000) ont prouvé que l'association de *Trichoderma* avec les racines réduit les maladies des racines par l'activation de la réponse de la défense des plantes.

3.2.5. Les métabolites de *Trichoderma harzianum*

Les espèces de *Trichoderma* sont capables de produire plus de 180 métabolites secondaires différents, selon les conditions environnementales, le sol, la plante et l'agent pathogène auquel elles sont confrontées. Ces métabolites appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset, 1998; Reino et al., 2008). Ces composés ont été caractérisés et classés en des composés volatiles, des composés diffusibles et des peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991). La littérature n'indique que les métabolites importants de *Trichoderma sp*, qui sont principalement des enzymes et des molécules bioactives :

- Production d'enzymes : la production des enzymes est variable d'une souche à une autre. Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autres hydrolases, sont parmi les métabolites diffusibles impliqués dans le mécanisme d'antibiose exercé par *Trichoderma* (Howell, 2003; Harman et al., 2004; Eziashi et al., 2006 ; Castro et al., 2010). Elles sont Exploitées dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003).
- Production de substances bioactives : *Trichoderma harzianum* est capables de produire différentes molécules bioactives, y parmi l'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles jouant un rôle dans la lutte biologique à l'égard des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń et al., 2013 ;Błaszczuk et al., 2014).

- Sécrétion des peptaïboles : ce sont des polypeptides ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antivirales. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les Viridines, Trichotoxines A et B, Trichorzianines A et B, Trichorzines et autres (**Reino et al., 2008 ; Andrabi et al., 2011**).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le présent travail porte sur l'isolement de quelques souches pathogènes du Blé dur et la mise en évidence de l'effet de *Trichoderma harzianum* agents de lutte biologique vis-à-vis de ses agents. Ce travail a été étalé sur plusieurs axes de recherche :

1. Prospection, échantillonnage et isolement des différents agents jugés pathogènes sur milieu de culture ordinaire.
2. Evaluation de l'efficacité *In Vitro* de l'espèce de *T. harzianum* sur la croissance mycélienne de quelques isolats obtenus. Cette évaluation a été réalisée selon trois méthodes : confrontation directe, confrontation indirecte et par les métabolites secondaires.
3. Détermination de l'activité enzymatique de *T. harzianum*.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) à Constantine.

1. Présentation de la zone d'échantillonnage

Le matériel végétal (Blé dur : *Triticum turgidum*) utilisé au cours de nos différentes expérimentations proviennent des sites situés dans les localités de El Kheroub (Figure 11) relevant de la wilaya de Constantine.

Les prélèvements des échantillons ont été effectués durant la fin du mois d'Avril de l'année 2018.

Les échantillons des plantes sont pris de manière aléatoire (au nombre de cinq plantes) dans la station concernée. Différentes parties des plantes (Racines, tiges, feuilles) de Blé dur présentant des symptômes typiques de maladies ont été prélevées dans des sachets en plastiques stériles puis ramenés au laboratoire pour analyse mycologique.



Figure 11 : Localité de site d'isolement : El khroub, Constantine.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Souche antagoniste

L'agent antagoniste (*T. harzianum*) utilisé pour évaluer l'activité antagoniste contre les isolats pathogènes provient de la mycothèque du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)), isolée et identifiée par le même laboratoire.

2.1.2. Souches pathogènes

Les souches pathogènes utilisées lors de nos essais, ont été isolés à partir de différentes plantes du Blé dur échantiogné dans la région d'El Khroub.

2.2. Milieux de culture (Annexe 1)

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés, au cours de nos différentes expérimentations. Pour toutes les manipulations réalisées, l'eau utilisée est de l'eau

distillée, et tous les milieux autoclavés pendant 20 minutes à 121°C avant leurs utilisations.

2.2.1. Milieu d'isolement

L'isolement des mycètes a été effectué sur le milieu gélose dextrose à la pomme de terre (en abrégé PDA, pour Potato Dextrose Agar). C'est un milieu de culture microbiologique courant produit à base d'infusion de pomme de terre et de dextrose.

Le milieu PDA, est le milieu le plus largement utilisé pour cultiver des mycètes qui attaquent les plantes vivantes ou la matière organique végétale en décomposition.

Le PDA a été préparé à partir d'un mélange de pommes de terre lavées et découpées en petits morceaux et d'eau distillée. Le mélange est mis à ébullition au Bain-Marie et la bouillie obtenue est filtrée. L'agar et le glucose sont ajoutés et la quantité d'eau est complétée jusqu'à 1000 ml. **(Ronald et Atlas, 1997).**

2.2.2. Milieu de purification

Le milieu choisi pour la purification des isolats est le milieu gélose Sabouraud. Ce dernier, permet la croissance d'une grande variété de levures et moisissures.

La préparation de ce milieu, consiste à dissoudre les différents ingrédients dans 1000 ml d'eau distillée. **(Ronald et Atlas, 1997).**

2.2.3. Milieu de fermentation

Pour la fermentation un milieu de culture à base d'extrait de Malt et d'extrait de levure (milieu M2) a été utilisé. Ce milieu permet une meilleure croissance de *T. harzianum*. Pour le préparer, il faut dissoudre de l'extrait de levure avec de l'extrait de Malt et l'agar dans une quantité suffisante (1000 ml) d'eau distillée **(Almi H, 2015).**

3. Méthodologie

3.1. Méthode d'isolement

Les plantes infectées collectées des sites prospectés (El Khroub), ont été découpées en petites pièces d'environ 0.5 cm. Les pièces obtenues sont désinfectées à l'hypochlorite de potassium à 2% pendant 3 min, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile et séchées entre du papier filtre stérile puis, placées dans des boîtes de Pétri (5 pièces/boîte) contenant le milieu PDA (Figure 12). Enfin, les boîtes sont incubées à 28°C pendant sept jours (**Belabid et al., 2000**).

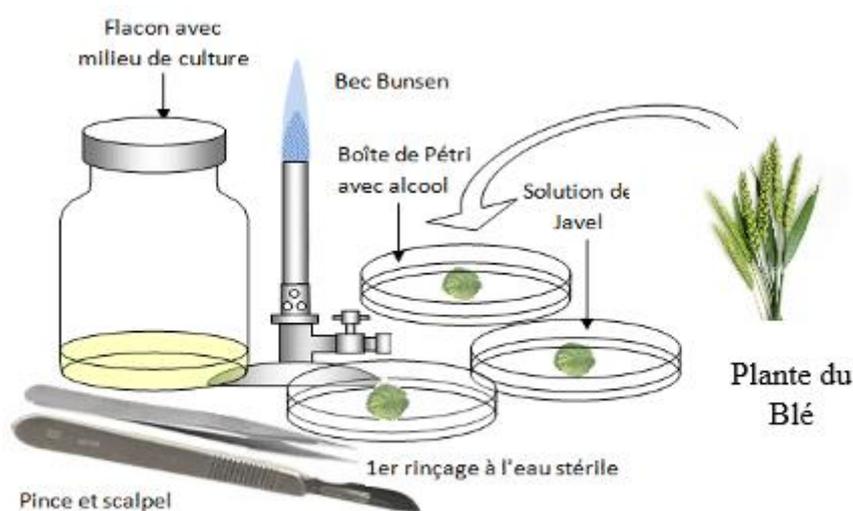


Figure 12 : Méthode d'isolement à partir des fragments des plantes du Blé dur.

3.2. Méthode de purification

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 cultureux 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 nouvelle boîte de Pétri contenant le milieu Sabouraud. 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. Méthode d'identification

La détermination des genres d'isolats obtenus a été effectuée par deux méthodes :

3.3.1. 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**).

3.3.2. Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue sur un petit fragment mycélien soigneusement prélevé à la marge du thalle à l'aide d'une Anse de Platine stérile. Le fragment prélevé est ensuite fixé avec de Lactophénole Bleu de Cotton (**Packer et Thomas, 1990**), ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycélium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et spores etc. (**Samson et al., 1988 ; Hawkswarth et al., 1994 ; Gams et al., 1998**).

Par ailleurs le taux de présence de chaque genre fongique isolé (plantes) est calculé selon la formule suivante (**Almi H, 2015**) :

$$G = (N_x / N_0) \times 100$$

Où :

G : Taux de présence (%) ;

N_x : Nombre des colonies isolées du même genre ;

N₀ : Nombre total des colonies isolées.

3.4. Méthode de conservation

Pour la conservation des souches prélevées on a utilisé le milieu PDA avec addition du Glycérol. 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 leurs viabilités et limiter les possibilités des variations (Botton *et al.*, 1990).

4. Les tests d'antagonismes

4.1. Méthode de confrontation directe

Cette méthode est également appelée également technique des cultures opposées. Elle est décrite par (Sivan et Chet, 1989), elle consiste à placer de façon diamétralement opposée sur des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu PDA, deux explants de 5 mm de diamètre, à une distance de 4 cm l'un de l'autre. Ces explants provenant des cultures des champignons, l'un portant la souche antagoniste à tester (*Trichoderma harzianum*) et l'autre l'agent pathogène impliqué (Figure 13). Les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours (Hibar *et al.*, 2005). Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA.

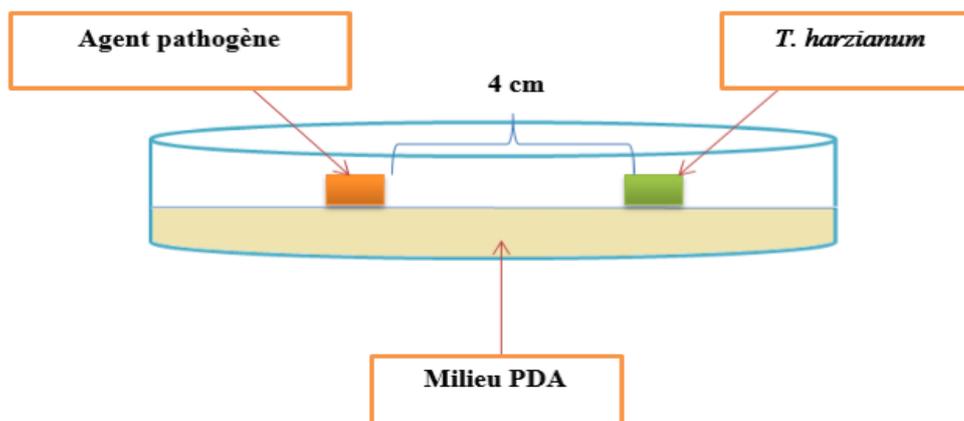


Figure 13 : Présentation schématique de la confrontation directe.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste au bout de 7 jours après l'inoculation et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement.

Le taux d'inhibition de *Trichoderma* testé est évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule proposé par (Sy, 1976 ; Vincent, 1990):

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

Où :

DT : Croissance diamétrale du témoin ;

DPA : Croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste,

IC%: Inhibition de la croissance.

4.2. Méthode de confrontation indirecte

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; contenant chacune 15 ml du milieu PDA, par la suite, un assemblage des deux boîtes est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et le pathogène en haut (Figure 14). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001).

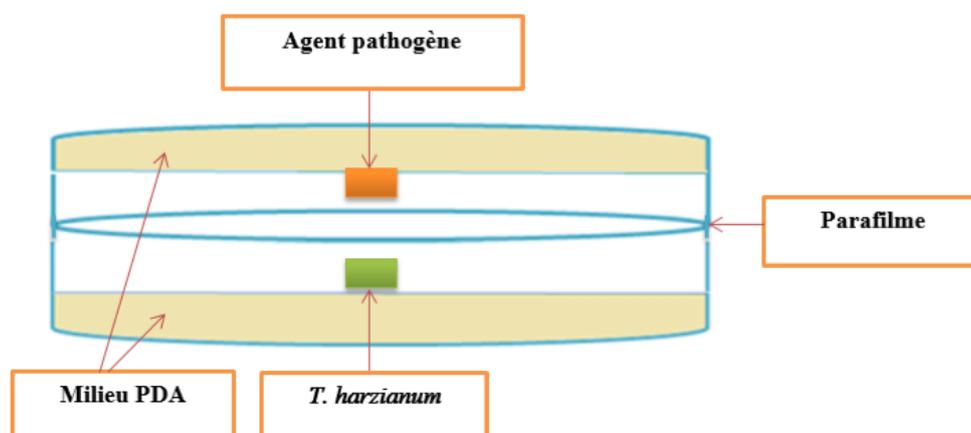


Figure 14: Présentation schématique de la confrontation indirecte.

La notation du diamètre moyen des colonies traitées a été réalisée tous les jours pendant 7 jours (Hmouni et al., 1996). L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma harzianum* est également estimée par la formule de (Sy, 1976 ; Vincent, 1990).

4.3. Test d'activité antifongique par des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum*

Ce test nécessite l'utilisation des métabolites secondaires qui sont obtenus suite à une fermentation. Les deux étapes aboutissant à la réalisation de ce test sont les suivantes :

- 1. La fermentation :** les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de fermentation M2. La stérilisation du milieu a été effectuée à 120°C pendant 20 min. Ensuite, les Erlenmeyers ont été inoculés par quatre disques de 5 mm de diamètre de *T. harzianum*. L'incubation a été effectuée à 25°C pendant 15 jours.
- 2. Tests d'activité antifongique :** afin de tester l'activité antifongique du surnageant de la culture, le contenu des Erlenmeyers de fermentation âgée de 15 jours, a été filtrée à travers du papier Whattman N°1, dans l'objectif de séparer le mycélium du milieu de culture contenant les métabolites bioactives. Par ailleurs, un volume égal de PDA fondu à 45°C est ajouté au filtrat de la souche *T.harzianum*, afin d'obtenir une concentration finale de 50% (v/v).

Le milieu de culture contenant le surnageant à tester, a été coulé dans des boîtes de Pétri, après solidification, ces derniers ont été inoculé avec des disques de pathogènes de 4 mm de diamètre. Un suivi du développement de l'agent pathogène est effectué chaque 24 heures pendant 7 jours.

5. Mise de l'activité enzymatique de la souche antagoniste

Trichoderma harzianum a été testée pour sa capacité et son potentiel de produire des enzymes comme la cellulase, la protéase, la lipase et la pectinase. La production de chaque enzyme a été détectée sur un milieu de culture solide contenant un substrat spécifique comme unique ou principale source de carbone.

5.1. L'activité protéolytique : l'activité protéolytique des souches antagonistes a été testée par la mise d'un disque *Trichoderma harzianum* sur un milieu à base de lait

(Annexe 3), coulé sur des boîtes de Pétri. Après incubation à 25°C pendant 3 à 4 jours. L'apparition d'un halo transparent autour des colonies signifie la présence de l'enzyme protéase (**Berg et al., 2002**).

5.2. L'activité cellulosique : la technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (en poudre à 0.5%) comme seule source carbonée. La production de l'enzyme cellulase se traduit par l'apparition d'une nette zone de lyse sur le milieu de culture (**Kasana et al., 2008**).

5.3. L'activité lipolytique : l'activité lipolytique des souches antagonistes, a été étudiée selon la méthode de (**Haliru et Bukola, 2012**). La technique consiste à repiquer les souches antagonistes sur un milieu à base d'huile. La production de l'enzyme lipase se traduit par l'apparition d'un halo blanc opaque au tour des colonies.

5.4. L'activité pectinolytique : la pectinase a été recherchée sur la gélose pectine agar, coulée en boîtes de pétri,ensemencée avec la souche à tester par touches, puis incubée à 30° C. L'apparition d'un halo claire indique la présence d'une activité pectinolytique (**Hankin et al., 1971**).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le présent travail a porté sur l'isolement des mycètes phytopathogènes à partir des échantillons du Blé dur variété CIRTA, ainsi que, sur la mise en évidence de l'effet antagoniste de la souche *Trichoderma harzianum*.

1. Identification des souches fongiques isolées

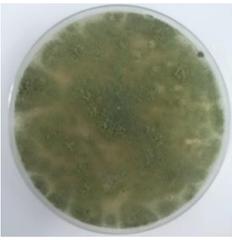
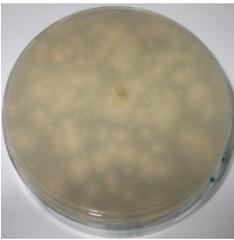
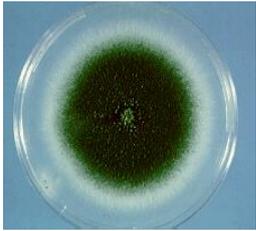
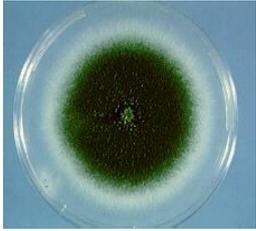
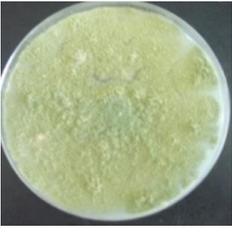
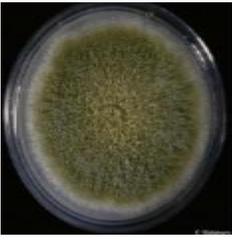
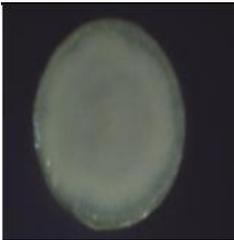
L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de (Botton, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Leyral et al., 1998) ainsi que celles de (Chabasse et al., 2002).

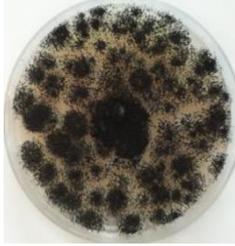
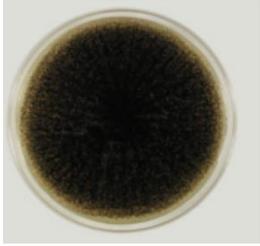
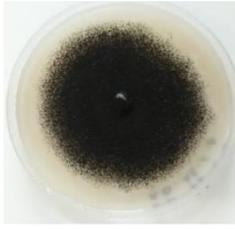
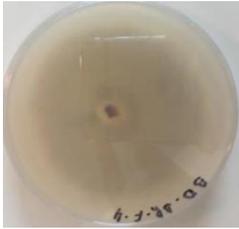
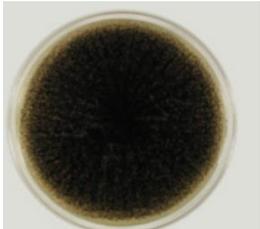
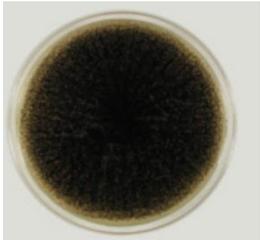
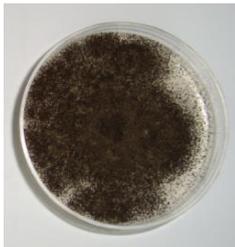
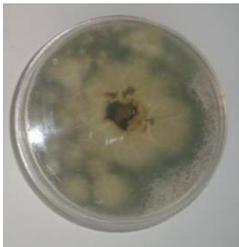
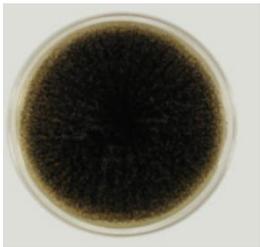
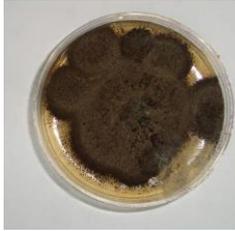
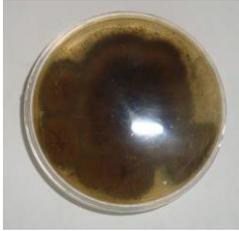
1.1. Identification macroscopique

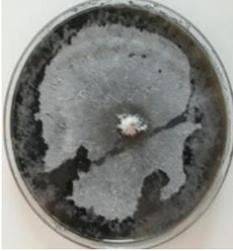
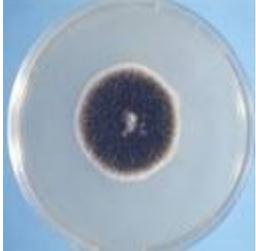
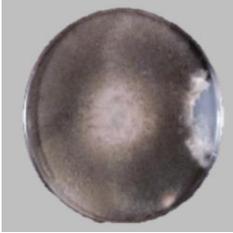
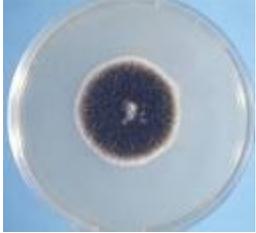
Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés à l'œil nu après leurs développement sur milieu PDA, le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le Tableau (03) résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la consistance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

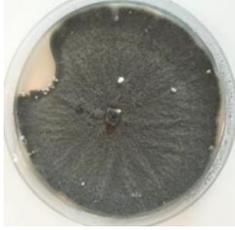
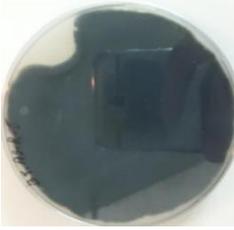
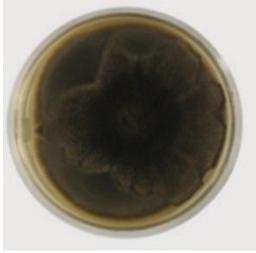
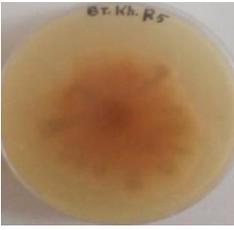
Tableau 03 : Caractères macroscopiques des souches isolées de différentes plantes du Blé dur.

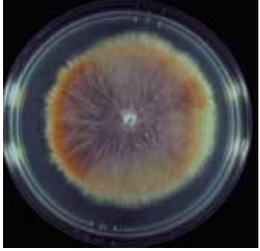
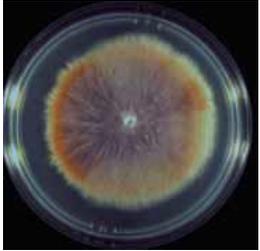
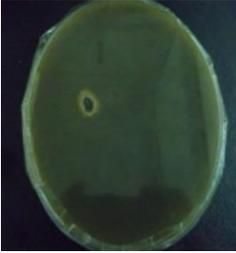
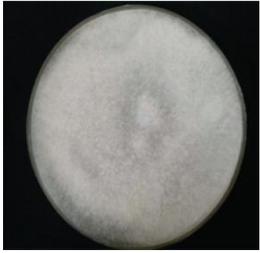
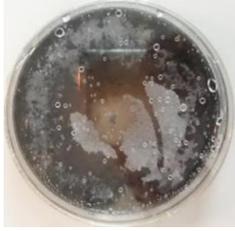
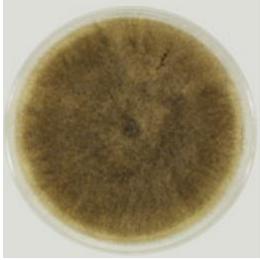
Isolats	Observation macroscopique		Aspect macroscopique	Référence (Chabasse et al., 2002)
	Surfaces	Revers		
1			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse à poudreuse. ➤Surface : colonies bleu-vert, deviennent vert-foncé à grise noirâtre. ➤Revers : brun-rouge. ➤Croissance très rapide. 	

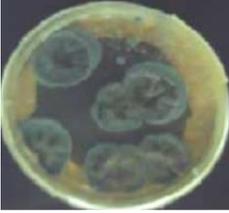
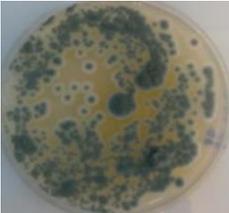
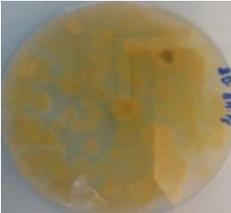
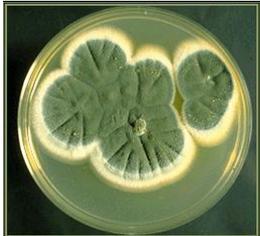
2			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse à poudreuse. ➤Surface : colonies vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance très rapide. 	
3			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse à poudreuse. ➤Surface : colonies vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance très rapide. 	
4			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : granuleux. ➤Surface : colonies d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune. ➤Revers : incolore. ➤Croissance très rapide. 	
5			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : granuleux. ➤Surface : colonies jaunes, puis vert-jaune. ➤Revers : incolore. ➤Croissance très rapide. 	
6			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : granuleux. ➤Surface : colonies jaunes, puis vertes-jaunes. ➤Revers : incolore. 	

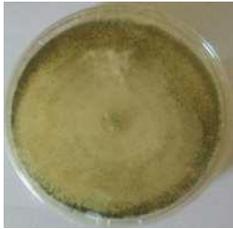
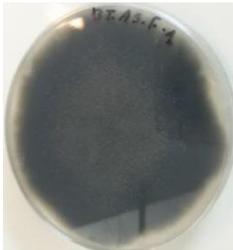
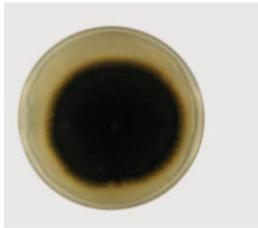
			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Croissance très rapide. 	
7			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Texture : granuleuse. ➤ Surface : colonies granuleuses noires. ➤ Revers : incolore à jaune pâle. ➤ Croissance très rapide. 	
8			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Texture : granuleux. ➤ Surface : colonies granuleuses noires. ➤ Revers : incolore. ➤ Croissance très rapide. 	
9			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Texture : granuleuse. ➤ Surface : colonies granuleuses noires. ➤ Revers : blanchâtre. ➤ Croissance très rapide. 	
10			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Texture : granuleuse. ➤ Surface : colonies granuleuses noires. ➤ Revers : incolore à jaune pâle. ➤ Croissance très rapide. 	
11			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Texture : granuleuse. ➤ Surface : colonies granuleuses beige à brunes. ➤ Revers : jaune sale à brun. 	

			<ul style="list-style-type: none"> ➤Croissance très rapide. 	
12			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse à laineuse. ➤Surface : colonies blanche gris au départ deviennent rapidement foncé. ➤Revers : foncé. ➤Croissance rapide. 	
13			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse à laineuse. ➤Surface : colonies blanche gris au départ deviennent rapidement foncé. ➤Revers : foncé. ➤Croissance rapide. 	
14			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse à laineuse. ➤Surface : colonies blanche grise. ➤Revers : foncé. ➤Croissance rapide. 	
15			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuse. ➤Surface : nodule au centre de couleur sombre. ➤Revers : présence des 	

			<p>points noirs.</p> <p>➤Croissance rapide.</p>	
16			<p>➤Texture : laineuse.</p> <p>➤Surface : colonies brunes olive au départ deviennent rapidement foncés.</p> <p>➤Revers : foncé.</p> <p>➤Croissance rapide.</p>	
17			<p>➤Texture : cotonneuses.</p> <p>➤Surface : colonies blanches à crème.</p> <p>➤Revers : pâle.</p> <p>➤Croissance très rapide.</p>	
18			<p>➤Texture : cotonneuses.</p> <p>➤Surface : colonies blanches à crème.</p> <p>➤Revers : pâle.</p> <p>➤Croissance très rapide.</p>	
19			<p>➤Texture : cotonneuses.</p> <p>➤Surface : colonies blanches.</p> <p>➤Revers : pourpre.</p> <p>➤Croissance : modérée.</p>	
20			<p>➤Texture : cotonneuses.</p> <p>➤Surface : colonies blanche ou crème, devient rose.</p>	

			<ul style="list-style-type: none"> ➤Revers : pourpre. ➤Croissance : modérée. 	
21			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : cotonneuses. ➤Surface : colonies pêche. ➤Revers : pourpre devient foncé. ➤Croissance : modérée. 	
22		/	<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : duveteuses. ➤Surface : colonies rose. ➤Revers : foncé. ➤Croissance : moyenne. 	
23			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : laineuse. ➤Surface : colonies blanches. ➤Revers : noire. ➤Croissance : rapide. 	
24			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : laineuse. ➤Surface : colonies brune au départ devient rapidement noire. ➤Revers : noire. ➤Croissance : rapide. 	
			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : poudreuse ➤Surface : colonies 	

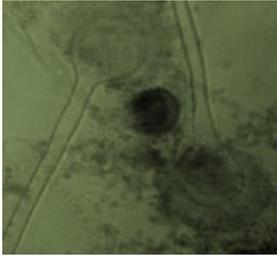
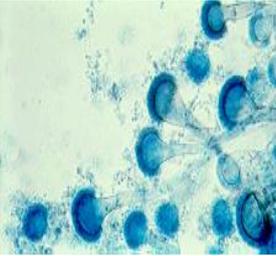
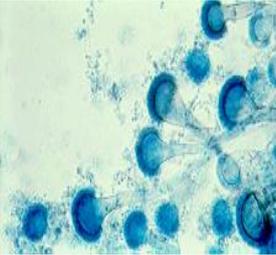
25			<p>vertes.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤Revers : foncé. ➤Croissance moyenne. 	
26			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : poudreuse ➤Surface : colonies vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance moyenne. 	
27			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : poudreuse ➤Surface : colonies vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance moyenne. 	
28			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : poudreuse. ➤Surface : colonies vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance moyenne. 	
29			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : poudreuse. ➤Surface : colonies blanches au départ, deviennent grises et foncées. ➤Revers : incolore. ➤Croissance très rapide. 	
			<ul style="list-style-type: none"> ➤Texture : laineuses. ➤Surface : colonies blanches au départ 	

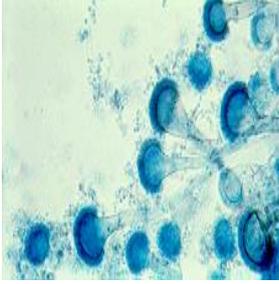
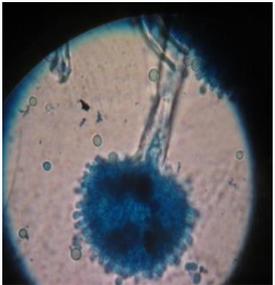
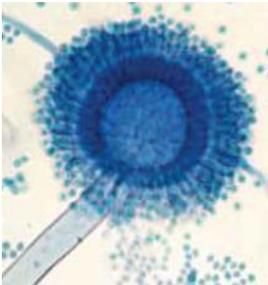
30			deviennent rapidement vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance rapide.	
31			➤Texture : laineuses. ➤Surface : colonies blanches au départ deviennent rapidement vertes. ➤Revers : incolore. ➤Croissance rapide.	
32			➤Texture : laineuses. ➤Surface : colonies brunes olive à noires. ➤Revers : noire. ➤Croissance rapide.	

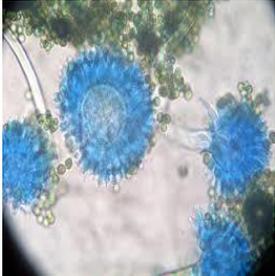
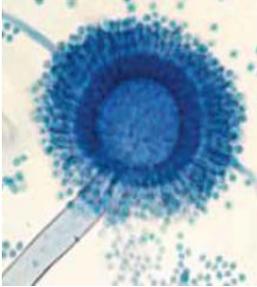
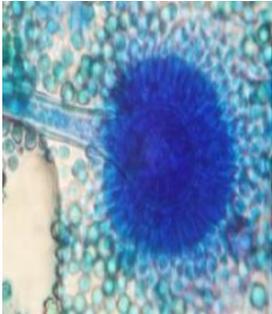
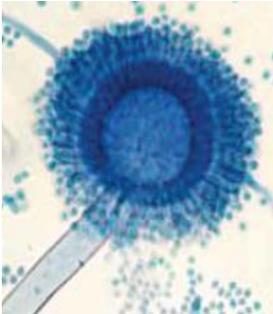
1.2. Identification microscopique

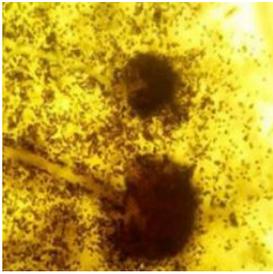
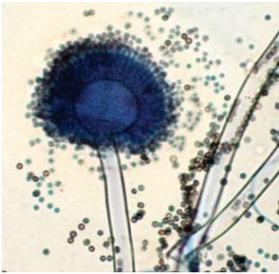
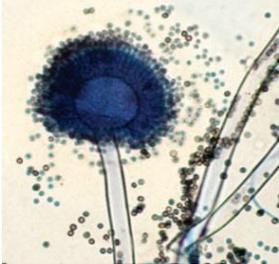
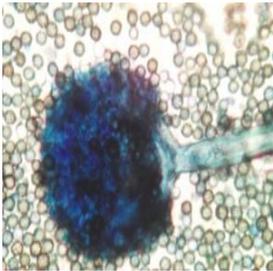
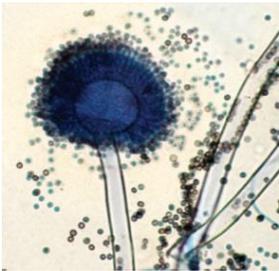
Les moisissures isolées ont été soumises à une deuxième identification plus approfondie que l'identification macroscopique. En effet, l'identification microscopique a été effectuée avec un microscope optique en moyennant l'objectif X 40. Cette identification était fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau (04) ci-dessous.

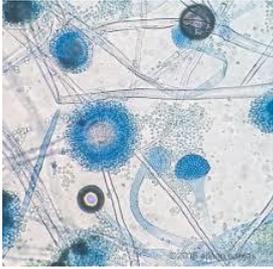
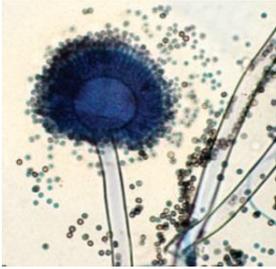
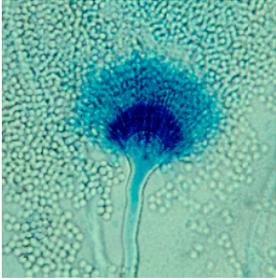
Tableau 04 : Caractères microscopiques des souches isolées de différentes plantes du Blé dur.

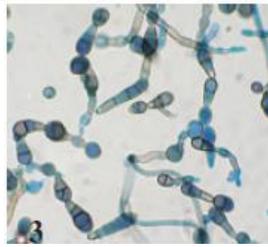
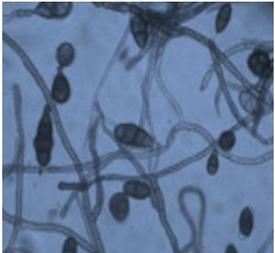
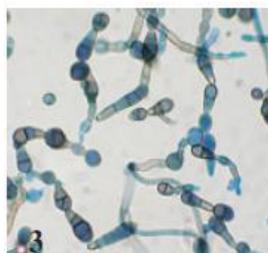
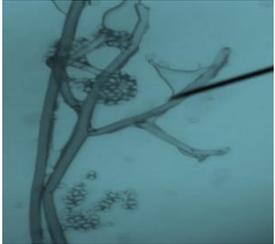
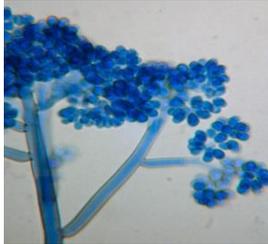
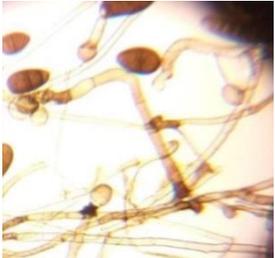
Isolats	Aspect microscopique X40	Photo Microscopique de Référence (Chabasse et al., 2002)	Morphologie microscopique	Identification des souches
1			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : courts, lisses, incolore, non ramifié. ➤ Vésicule : hémisphérique. ➤ Les phialides dressés, sont densément groupés, de couleur verte. ➤ Les conidies : sont globuleuses à sub-globuleuses, verte. ➤ Tête aspergillaire : strictement unisériée, en colonne compacte verte. 	<p><i>Aspergillus sp1</i></p>
2			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : courts, lisses, incolore, non ramifié. ➤ Vésicule : hémisphérique. ➤ Les phialides dressés, sont densément groupés, de couleur verte. ➤ Les conidies : sont globuleuses à sub-globuleuses, verte. ➤ Tête aspergillaire : strictement unisériée, en colonne compacte verte. 	<p><i>Aspergillus sp2</i></p>

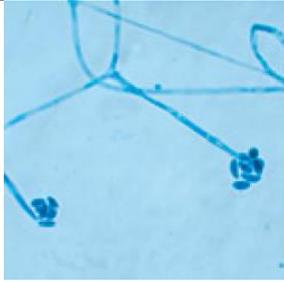
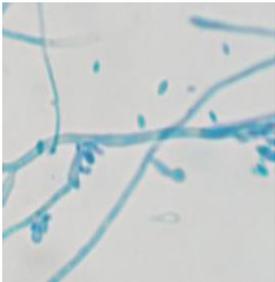
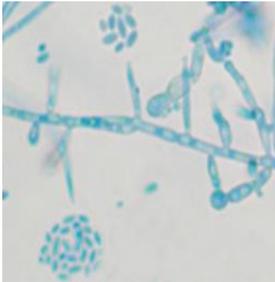
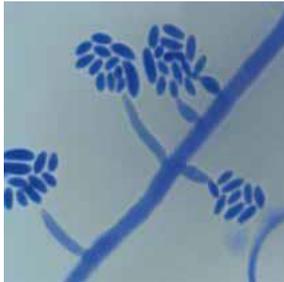
<p>3</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤Mycélium : cloisonné. ➤Les conidiophores : courts, lisses, incolore, non ramifié. ➤Vésicule : hémisphérique. ➤Les phialides dressés, sont densément groupés, de couleur verte. ➤Les conidies : sont globuleuses à sub-globuleuses, verte. ➤Tête aspergillaire : strictement unisériée, en colonne compacte verte. 	<p><i>Aspergillus sp3</i></p>
<p>4</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤Mycélium : cloisonné. ➤Les conidiophores : long, incolore, hyalins. ➤Vésicule : sphérique. ➤Les phialides : sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métures. ➤Les conidies : grosses, globuleuses à sub-globuleuses, vert- pâle. ➤Tête aspergillaire : strictement unisériée, en colonne compacte. 	<p><i>Aspergillus sp4</i></p>

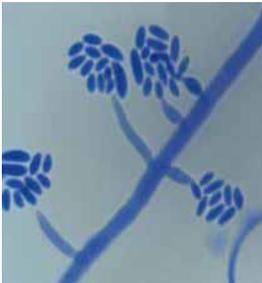
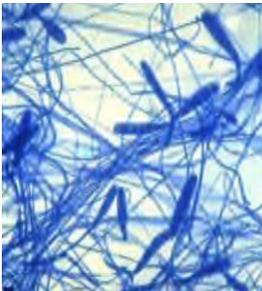
<p>5</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤Mycélium : cloisonné. ➤Les conidiophores : long, incolore, hyalins. ➤Vésicule : sphérique. ➤Les phialides : sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métures. ➤Les conidies : grosses, globuleuses à sub globuleuses, vert-pâle. ➤Tête aspergillaire : strictement unisériée, en colonne compacte. 	<p><i>Aspergillus sp5</i></p>
<p>6</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤Mycélium : cloisonné. ➤Les conidiophores : long, incolore, hyalins. ➤Vésicule : globuleuses. ➤Les phialides : sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métures. ➤Les conidies : grosses, globuleuses à sub globuleuses, vert- pâle. ➤Tête aspergillaire : strictement unisériée, en colonne compacte. 	<p><i>Aspergillus sp6</i></p>

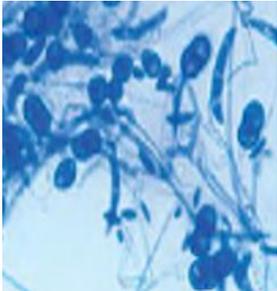
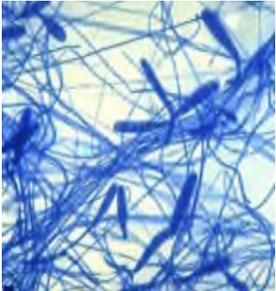
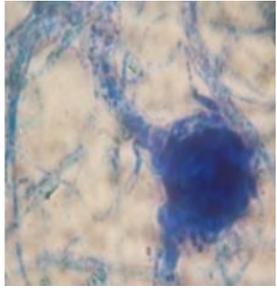
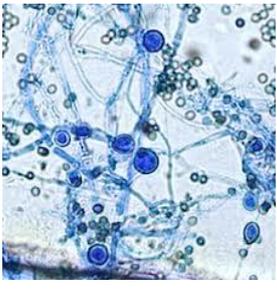
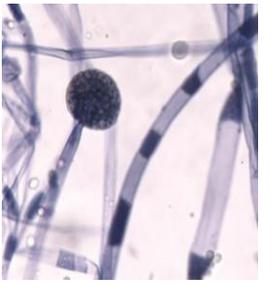
<p>7</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : longs hyalins. ➤ Vésicule : globuleuses. ➤ Les phialides : sont portées par des métures. ➤ Les conidies : sont globuleux, bruns. ➤ Tête aspergillaire : bisériée, radiée, disposée en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. 	<p><i>Aspergillus sp7</i></p>
<p>8</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : longs hyalins. ➤ Vésicule : globuleuses. ➤ Les phialides : sont portées par des métures. ➤ Les conidies : sont globuleux, bruns. ➤ Tête aspergillaire : bisériée, radiée, disposée en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. 	<p><i>Aspergillus sp8</i></p>
<p>9</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : longs hyalins. ➤ Vésicule : globuleuses. ➤ Les phialides : sont portées par des métures. ➤ Les conidies : sont 	<p><i>Aspergillus sp9</i></p>

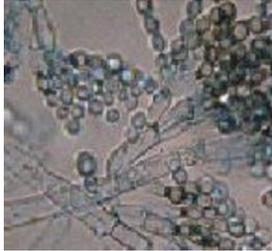
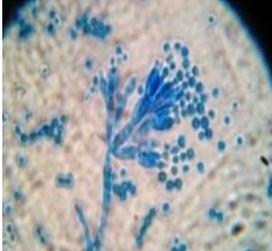
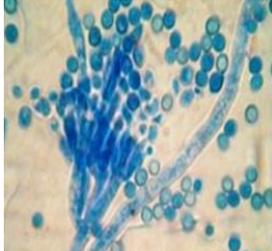
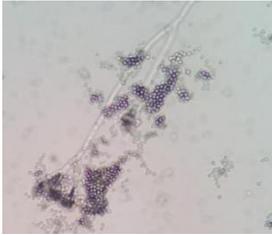
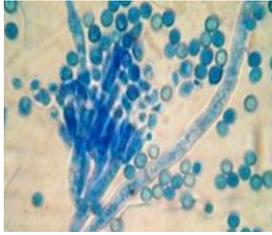
			<p>globuleuses, brunes.</p> <p>➤Tête aspergillaire : bisériée, radiée, disposait en plusieurs colonnes brunâtres ou noires.</p>	
10	 		<p>➤Mycélium : cloisonné.</p> <p>➤Les conidiophores : longs hyalins.</p> <p>➤vésicule : globuleuses.</p> <p>➤Les phialides : sont portées par des métures.</p> <p>➤Les conidies : sont globuleuses, brunes.</p> <p>➤Tête aspergillaire: bisériée, radiée, disposait en plusieurs colonnes brunâtres ou noires.</p>	<i>Aspergillus sp10</i>
11	 		<p>➤Mycélium : cloisonné.</p> <p>➤Les conidiophores : longs hyalins.</p> <p>➤Vésicule : globuleuses.</p> <p>➤Les phialides : sont portées par des métures.</p> <p>➤Les conidies : sont globuleuses.</p> <p>➤Tête aspergillaire: bisériée, radiée, disposait en plusieurs colonnes.</p>	<i>Aspergillus sp11</i>
			<p>➤Filaments : septés, fin et régulier bruns foncés à noirs.</p>	

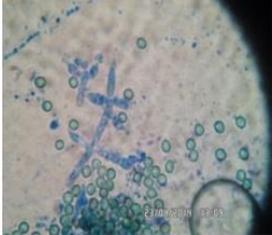
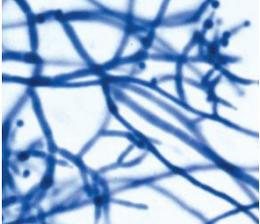
12			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Conidies : pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières. ➤ Spores à paroi lisse sont souvent disposées en chaînes. 	<i>Alternaria sp1</i>
13			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Filaments : septés, fin et régulier bruns foncés à noirs. ➤ Conidies : pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières. ➤ Spores à paroi lisse sont souvent disposées en chaînes. 	<i>Alternaria sp2</i>
14			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Filaments : septés, fin et régulier bruns foncés à noirs. ➤ Conidies : pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières. ➤ spores à paroi lisse sont souvent disposées en chaînes. 	<i>Alternaria sp3</i>
15			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Filaments : non septés. ➤ Conidies : ronde. 	<i>Botrytis sp</i>
16			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : bruns ramifiés. ➤ les conidies : brunes pluricellulaires. 	<i>Curvularia sp</i>
			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de 	

<p>17</p>			<p>longues mono phialides d'aspect cylindrique.</p> <p>➤Microconidies : unicellulaires ou bicellulaires disposées en « fausses têtes »ou glissant le long des phialides.</p> <p>➤Macro-conidies : fusiformes et cloisonnées.</p> <p>➤Les chlamydospores, sont présentes en position terminale.</p>	<p><i>Fusarium sp1</i></p>
<p>18</p>			<p>➤Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de longues mono phialides d'aspect cylindrique.</p> <p>➤Microconidies : unicellulaires ou bicellulaires disposées en « fausses têtes »ou glissant le long des phialides.</p> <p>➤Macro-conidies : fusiformes et cloisonnées.</p> <p>➤Les chlamydospores, sont présentes en position terminale.</p>	<p><i>Fusarium sp2</i></p>
<p>19</p>			<p>➤Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de longues mono phialides d'aspect cylindrique.</p> <p>➤Microconidies : unicellulaires ou bicellulaires</p>	<p><i>Fusarium sp3</i></p>

			<p>disposées en « fausses têtes » ou glissant le long des phialides.</p> <p>➤ Macro-conidies : fusiformes et cloisonnées.</p> <p>➤ Les chlamydozoospores, sont présentes en position terminale.</p>	
20	 		<p>➤ Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de longues mono phialides d'aspect cylindrique.</p> <p>➤ Microconidies : unicellulaires ou bicellulaires disposées en « fausses têtes » ou glissant le long des phialides.</p> <p>➤ Macro-conidies : fusiformes et cloisonnées.</p> <p>➤ Les chlamydozoospores, sont présentes en position terminale.</p>	<i>Fusarium sp4</i>
21	 		<p>➤ Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de longues mono phialides d'aspect cylindrique.</p> <p>➤ Microconidies : unicellulaires ou bicellulaires disposées en « fausses têtes » ou glissant le long des phialides.</p> <p>➤ Macro-conidies : fusiformes</p>	<i>Fusarium sp5</i>

			<p>et cloisonnées.</p> <p>➤ Les chlamydo-spores, sont présentes en position terminale.</p>	
22			<p>➤ Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de longues mono phialides d'aspect cylindrique.</p> <p>➤ Microconidies : unicellulaires ou bicellulaires disposées en « fausses têtes » ou glissant le long des phialides.</p> <p>➤ Macro-conidies : fusiformes et cloisonnées.</p> <p>➤ Les chlamydo-spores, sont présentes en position terminale.</p>	<i>Fusarium sp6</i>
23			<p>➤ Mycélium : non cloisonné.</p> <p>➤ Sporocystophores : terminent par une columelle ovoïde.</p> <p>➤ Sporocystes : globuleux.</p> <p>➤ Spores : rondes</p> <p>➤ Chlamydo-spores : présentes.</p>	<i>Mucor sp1</i>
24			<p>➤ Mycélium : non cloisonné.</p> <p>➤ Sporocystophores : terminent par une columelle ovoïde.</p> <p>➤ Sporocystes : globuleux.</p> <p>➤ Spores : rondes</p> <p>➤ Chlamydo-spores : présentes.</p>	<i>Mucor sp2</i>

<p>25</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : lisses, ramifiés qui se terminent par un pénicille. ➤ Les phialides : Les phialides sont disposés en verticilles à l'extrémité des conidiophores. ➤ Les conidies : sont globuleuses, lisses, verdâtres. 	<p><i>Penicillium sp1</i></p>
<p>26</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : lisses, ramifiés qui se terminent par un pénicille. ➤ Les phialides : sont portés par des métures. ➤ Les conidies : sont globuleuses, lisses. 	<p><i>Penicillium sp2</i></p>
<p>27</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : lisses, ramifiés qui se terminent par un pénicille. ➤ Les phialides : sont portées par des métures. ➤ Les conidies : sont globuleuses, lisses. 	<p><i>Penicillium sp3</i></p>
<p>28</p>			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : lisses, ramifiés qui se terminent par un pénicille. ➤ Les phialides : sont portées par des métures. 	<p><i>Penicillium sp4</i></p>

			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les conidies : sont globuleuses, lisses. 	
29			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Sporocystophores : bruns disposés en bouquets. ➤ Sporocystes : globuleux avec une columelle brune, globuleux. 	<i>Rhizopus sp</i>
30			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : ramifiés à angle droit. ➤ Les conidies : lisses, globuleuses. ➤ Les phialides : en forme de quille. 	<i>Trichoderma sp1</i>
31			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné. ➤ Les conidiophores : ramifiés à angle droit. ➤ Les conidies : lisses, globuleuses. ➤ Les phialides : en forme de quille. 	<i>Trichoderma sp2</i>
32			<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mycélium : cloisonné brun. ➤ Les conidiophores : courts septés, non ramifiés. ➤ Les conidies : brunes, ovoïdes. 	<i>Ulocladium sp</i>

2. Étude statistique

Les échantillons du blé dur prélevés, révèlent des taux de contamination très important. En effet, 32 isolats fongiques ont été isolés à partir de différentes parties décortiquées du blé (Feuilles, tiges et racines)

L'identification macroscopique et microscopique des isolats, a permis de répartir l'ensemble des isolats en 10 genres à savoir : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, et *Ulocladium*.

L'analyse des résultats montre, par ordre décroissant, que le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 34 %, suivie du genre *Fusarium* avec un pourcentage de 19 %, le genre *Penicillium* avec un pourcentage de 13%, le genre *Alternaria* avec un pourcentage de 10%, les genres *Mucor* et *Trichoderma* avec un pourcentage de 6% et enfin les genres *Curvularia*, *Rhizopus* et *Ulocladium* avec un pourcentage de 3 % donc un seul isolat pour chacun. (Figure 15).

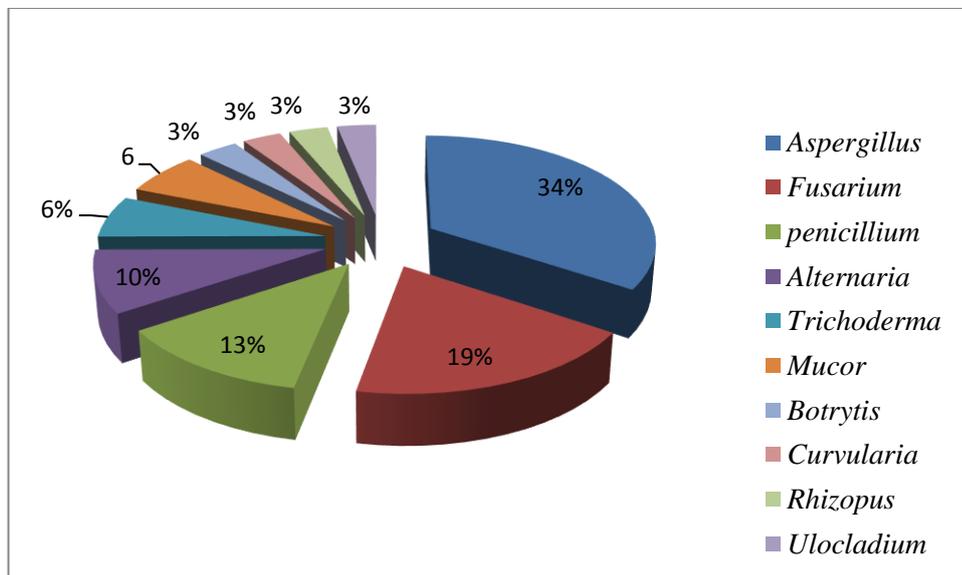


Figure 15 : Pourcentages des différents genres fongiques obtenus à partir d'échantillons du blé dur de la région d'El Khroub.

3. Les tests d'antagonismes

L'activité antifongique de *Trichoderma harzianum* a été largement décrite *In Vitro* dans plusieurs études. Dans cette étude nous avons testé l'activité antifongique d'un total de 05/32 isolats représentant les genres : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* et *Penicillium*. Pour ce faire trois types de tests ont été utilisés, à savoir : la confrontation directe, la confrontation indirecte et le test d'activité antifongique par les métabolites secondaires de *T. harzianum*.

3.1. Test de confrontation directe

Ce test a été réalisé en mettant en contact direct l'isolat antagoniste et la souche pathogène. Les résultats obtenus (Tableau 05) montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène/Antagoniste).

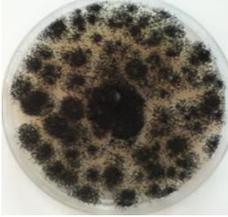
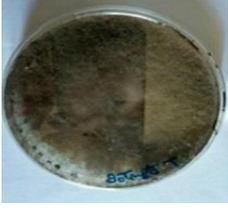
Après 7 jours d'incubation à 28C°, une action inhibitrice a été observée, cette action est exercée par *Trichoderma harzianum* vis-à-vis de la croissance mycélienne des isolats pathogènes testés.

La croissance de *Trichoderma harzianum* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition (**Dubos, 1985 ; Daved, 1996**). Ces résultats peuvent être aussi expliqués par le mécanisme d'antibiose, qui est dû à la sécrétion de substances agissant comme étant des antibiotiques et qui inhibent aussi la croissance du pathogène.

Ces observations sont en accord avec des études menées par (**Haran et al., 1996 ; Zhihe et al., 1998**). Qui ont prouvé que *T. harzianum* produit des substances qui agissent comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance d'agents pathogènes.

L'évaluation des diamètres d'inhibition exercée par *T. harzianum* estimée confirme ces résultats observés sur boîte de Pétri (Annexe 02). Les résultats de calcul des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes en présence de *T. harzianum*, sont mentionnés dans le (tableau 05).

Tableau 05 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches pathogènes par *T.harzianum* : cas de confrontation directe.

Isolats	Témoin	Résultats de test d'antagonisme		Pourcentage d'inhibition
		Surface	Revers	
<i>Aspergillus sp</i>				44%
<i>Alternaria sp</i>				62%
<i>Botrytis sp</i>				44%
<i>Fusarium sp</i>				50%
<i>Penicillium sp</i>				50%

3.2. Test de confrontation indirecte

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de *T. harzianum* sur différents les différents isolats pathogènes cités précédemment.

Les résultats obtenus (Tableau 06) montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches pathogènes exercées par *T. harzianum* comparativement aux témoins.

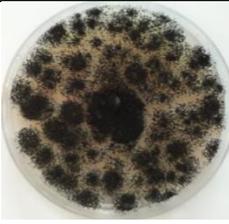
Contrairement au test de confrontation directe, on a remarqué que la croissance mycélienne continue à évoluer avec le temps mais d'une manière plus lente.

Malgré l'absence d'un contact direct entre l'agent pathogène et la souche antagoniste, il y a un effet inhibiteur exercé par *T. harzianum* sur le développement des colonies des isolats.

Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies des pathogènes cultivés en présence et en absence de l'antagoniste (Annexe 03).

En effet, il a été prouvé que *T. harzianum* a la capacité de produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène (Hiber et al., 2005). Cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma*. Dennis et Webstres (1971), ont montrés que *Trichoderma* émette des substances chimiques toxiques qui sont des dérivées de l'hydrazine sous forme de substances volatiles importantes.

Tableau 06 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches pathogènes par *T.harzianum* : cas de confrontation indirecte.

Isolats	Témoin	Résultats de test d'antagonisme		Pourcentage d'inhibition
		Surface	Revers	
<i>Aspergillus sp</i>				13%
<i>Alternaria sp</i>				63%

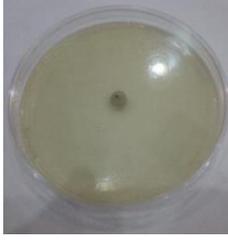
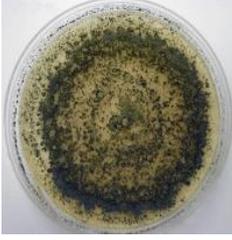
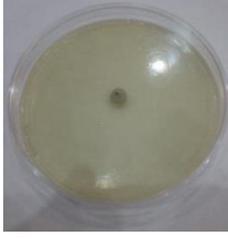
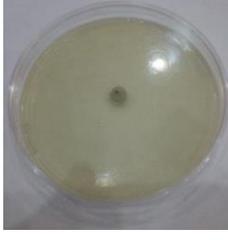
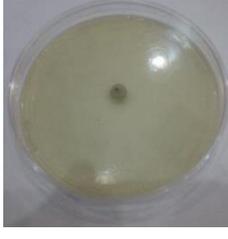
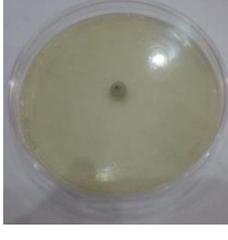
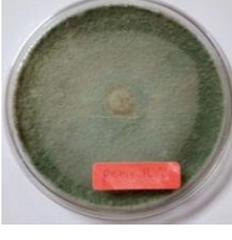
<i>Botrytis sp</i>				44%
<i>Fusarium sp</i>				25%
<i>Penicillium sp</i>				13%

3.3. Test d'activité antifongique par les métabolites secondaires de *T. harzianum*

Les métabolites secondaires issus de la fermentation de *Trichoderma harzianum*, ont été testés *In Vitro* pour évaluer leurs effets antifongiques vis-à-vis des pathogènes en question.

D'après le (tableau 07), on remarque que l'effet inhibiteur des métabolites secondaires de *T. harzianum* est moins important que celui exercé par le mycélium. Les diamètres de lyses mesurés varient de 5 à 40 mm.

Tableau 07 : Diamètres de lyses des souches pathogènes par *T. harzianum*.

Isolats	Avant incubation	Après incubation		Diamètre de lyse (mm)
		Surface	Revers	
<i>Aspergillus sp</i>			/	40
<i>Alternaria sp</i>				5
<i>Botrytis sp</i>		/		20
<i>Fusarium sp</i>		/		15
<i>Penicillium sp</i>				15

4. Mise en évidence de l'activité enzymatique de la souche antagoniste

Au total, quatre activités enzymatiques de *Trichoderma harzianum* ont été étudiées.

4.1. L'activité protéolytique

L'activité protéolytique de la souche antagoniste *T. harzianum* a été testée sur un milieu à base du lait. La production de l'enzyme protéase, est traduite par l'apparition d'une zone transparente sur le milieu de culture (Figure 16).

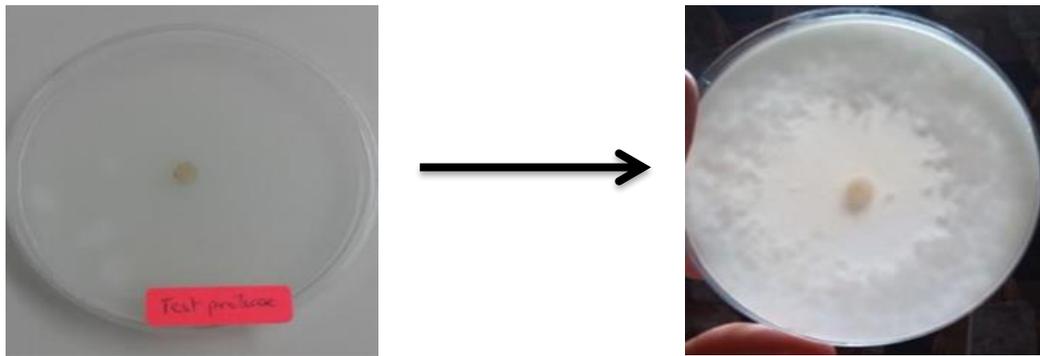


Figure 16: Test de l'activité protéolytique de *T. harzianum*.

Les résultats de l'activité protéolytique montrent une transparence du milieu de culture ensemencée par *T. harzianum*. Ce résultat confirme la production de l'enzyme protéase par la souche antagoniste *T. harzianum*.

4.2. L'activité cellulolytique

L'activité cellulolytique de *T. harzianum* a été testée sur un milieu solide à base de cellulose comme seule source carbonée. Ce teste permet de maitre en évidence la capacité des moisissures à assimiler la cellulose.

La production de l'enzyme cellulase se traduit par l'apparition d'un halo transparent sur le milieu de culture (Figure 17).

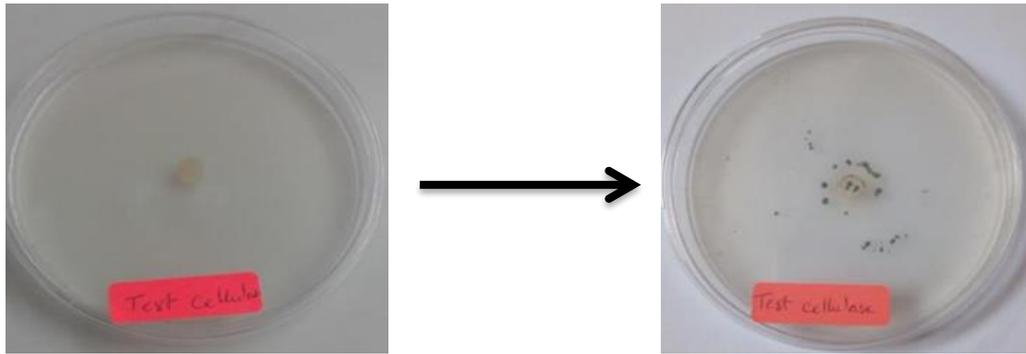


Figure 17: Test de l'activité cellulolytique de *T. harzianum*.

Le résultat de ce test, observé après incubation montre l'apparition d'une zone de lyse signifiant la production de la cellulase par *T. harzianum*.

4.3. L'activité lipolytique

Le test de l'activité lipolytique de *T. harzianum*, réalisé sur un milieu de culture à base d'huile Tributyrine, montre le développement de plusieurs zones de lyse autour des points de croissance de *Trichoderma harzianum*. Ce résultat se traduit par la production de l'enzyme lipase qui dégrade les différentes molécules de nature lipidique composante de l'huile (Figure 18).

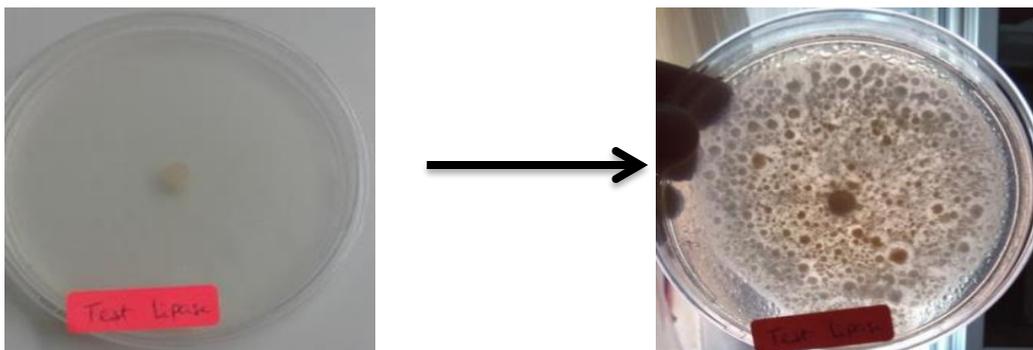


Figure 18 : Test de l'activité lipase de *T. harzianum*.

4.4. L'activité pectinolytique

L'activité pectinolytique de la souche antagoniste *T. harzianum* a été prouvée sur un milieu préparé avec la pectine. La production de l'enzyme pectinase, c'est traduit par l'apparition d'une zone transparente sur le milieu de culture (Figure 19).

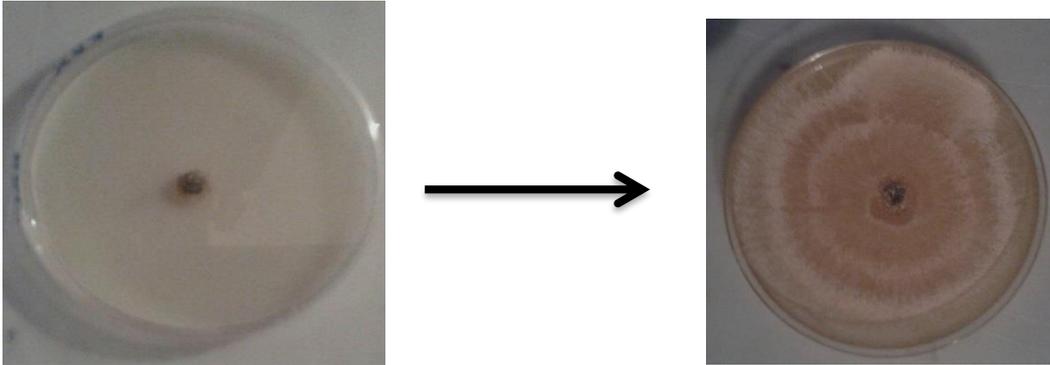


Figure 19: Test de l'activité pectinolytique de *T. harzianum*.

CONCLUSION

En Algérie, la culture du blé occupe une place importante dans l'alimentation humaine et animale. Cependant, le développement des champignons filamenteux pathogènes sur ces substrats peut provoquer une diminution de la qualité nutritive avec une altération des propriétés organoleptique.

Le travail présenté dans cette étude a porté sur l'isolement de quelques agents pathogènes causales de maladies cryptogamiques fongiques du blé dur et de mise en évidence de l'effet de l'agent antagoniste *Trichoderma harzianum* sur certains isolats obtenus.

En effet, les analyses mycologiques effectuées sur les échantillons de blé dur ont permis d'isoler 32 souches fongiques à partir de différentes parties végétatives des plantes.

La purification et l'identification des isolats ont donné la possibilité d'identifier 10 genres à savoir : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, et *Ulocladium*

Par ailleurs, les différents tests d'antagonismes menés *In Vitro* contre cinq isolats pathogènes du blé ont donné des résultats positifs par l'ensemble des méthodes testées (confrontation direct et indirect ainsi que les métabolites secondaires) en moyennant *Trichoderma harzianum* 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.

Les pourcentages d'inhibitions exécrées par *T. harzianum* dans le cas de confrontation directe ont varié entre 44 et 62% et entre 12 et 63% dans le cas de confrontation indirecte. Tandis que, la plus grande zone de lyse obtenue dans le test des métabolites secondaires a été de l'ordre de 40 mm, obtenue avec le pathogène *Aspergillus sp.*

Les tests d'activités enzymatique de la souche antagoniste, prouve que la souche testée représente une source très importante d'enzymes lytiques à savoir la cellulase, la protéase, pictinase et lipase.

Enfin, ce travail présente une simple contribution à la connaissance de la protection du blé contre les maladies causés par les champignons phytopathogènes n'est pas une fin en soi, mais un début d'action ou modèle pour d'autres recherches sur d'autres cultures, d'autres

pathogènes et antagonistes, les études plus approfondies sur les métabolites qui induisent l'inhibition du pathogène serait éventuellement appropriée.

Résumé

Au total, 32 souches fongiques ont été isolées à partir des échantillons de blé dur échantillonnés dans la région d'El Khroub.

La purification et l'identification des isolats ont permis d'obtenir 10 genres fongique à savoir : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, et *Ulocladium*.

Les différents tests d'antagonismes menés *In Vitro* avec *Trichoderma harzianum*, contre cinq isolats pathogènes ont donné des résultats positifs par l'ensemble des méthodes testées (confrontation direct et indirect ainsi que les métabolites secondaires) en moyennant comme souche antagoniste.

Les pourcentages d'inhibitions exercées par *T. harzianum* dans le cas de confrontation directe ont varié entre 44 et 62% et entre 12 et 63% dans le cas de confrontation indirecte. Tandis que, la plus grande zone de lyse obtenue dans le test des métabolites secondaires a été de l'ordre de 40 mm, obtenue avec le pathogène *Aspergillus sp.*

Les tests d'activités enzymatique de la souche antagoniste, prouve que la souche testée représente une source très importante d'enzymes lytiques à savoir la cellulase, la protéase, pectinase et lipase.

Mots Clés: Lutte biologique, maladies fongiques, blé dur, *Trichoderma harzianum*, Constantine

Abstract

A total of 32 fungal strains were isolated from the durum samples sampled in the ElKhroub area. Purification and identification of isolates yielded 10 fungal genera namely *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, and *Ulocladium*.

The different tests of In Vitro antagonism with *Trichoderma harzianum*, against five pathogenic isolates gave positive results by all the methods tested (direct and indirect confrontation as well as the secondary metabolites) by averaging as antagonistic strain.

The percentages of inhibitions extorted by *T. harzianum* in the case of direct confrontation varied between 44 and 62% and between 12 and 63% in the case of indirect confrontation. While, the largest area of lysis obtained in the test of secondary metabolites was of the order of 40 mm, obtained with the pathogen *Aspergillus sp.*

The enzymatic activity tests of the antagonist strain, proves that the strain tested represents a very important source of lytic enzymes namely cellulase, protease, pectinase and lipase.

Key words: biological control, fungal diseases, durum wheat

***Trichoderma harzianum*, Constantine**

ملخص

تم عزل 32 سلالة فطرية من نبات القمح أخذت من بلدية الخروب ولاية قسنطينة.

بعد تنقية و تحديد العزلات مجهريا تحصلنا على 10 سلالات:

Aspagillus, Alternaria, Botrytis, Curvelaria, Fusarium, Mucor, Penicillium,

Rhizopus, Trichoderma و *Ulocladuim.*

نفذنا اختبارات مختلفة في المختبر مع *Trichoderma harianum* ضد سلالات التي

أعطت نتائج ايجابية لجميع طرق الاختبار (المواجهة المباشرة و غير المباشرة و المركبات

الثانوية) عن طريق حساب متوسط باعتبارها سلالة خصم.

و تراوحت النسب المؤوية للتثبيط بواسطة *Trichoderma harianum* في حالة

المواجهة المباشرة بين 44 و 62% و بين 12 و 63% في حالة المواجهة الغير مباشرة.

اختبارات الأنشطة الأنزيمية من السلالة الغذائية يدل على أن سلالة الاختبار هو مصدر

مهم جدا من الأنزيمات التحليلي أي السيليلاز، البروتياز، البيكتيناز و الليياز.

الكلمات المفتاحية:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Alliès., Kang., Bissett., Duthil., Gate. (2004)** Evaluation du métabolisme respiratoire et enzymatique des racines de blé dur (*Triticum durum* Desf) issues de plantes infectées par les maladies cryptogamiques et de plantes traitées avec un fongicide (ARTEA EC 330). Thèse de doctorat en Toxicologie Cellulaire. Université Badji Mokhtar, Annaba. P 54-85.

- **Almi H., Oufroukh A., Dehimat L., Kacem Chaouche N., Sabri A. et Thonart P. (2015)** Effect of Two *Trichoderma harzianum* Species in *Fusarium solani* and *Cylindrosporium sp*, pathogens of *Lens culinaris*. International Journal of Recent Scientific Research. 6, P 7556-7560.

- **Andrabi, S.A., Kang, H.C., Haince, J.F., Lee, YI., Zhang, J, Chi, Z., West, A.B., Koehler, R.C., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2011).** Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer induced cell death. Nat Med 17:692– 699.

- **Anonyme. (2005).** Photologie des plantes. p16.

- **Apperit, J. (1985).** Dégâts, pertes et moyens de stockage. Le stockage des produits Vivrier et de la semence. A. C. T. A Ed. Maison. Neuve et la rousse. Paris. Volume I. 113 p.

B

- **Bajji M. (1999).** Étude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur : caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance à la sécheresse et de variants somaclonaux sélectionnés *In vitro*. Thèse de doctorat. Université. Louvain.

- **Belabid L., Fortas Z., Dalli D., Khiare M. et Amdjad D. (2000).** Flétrissement et pourriture racinaire de la lentille dans le nord-ouest Algérien. , Phytopathologie, Institut d'agronomie, BP 763, Mascara, 29000 Algérie. Cahiers Agricultures.

- **Benbrook C.M., Groth E., Halloran J.M., Hansen M.K. and Marquardt S. (1996).**

Pest management at the crossroads, Consumers Union, Yonkers. 272 p.

- **Berg J. M. Tymoczko J. L., Stryer L. (2002).** Biochemistry. 5th edition. New York: Freeman.

-**Bissett, J. (2004).** Communication personnelles.

- **Botarela. (2012).** Blé tendre, froment (*Triticum aestivum*) ; epeautre, grand epeautre

(*triticum aestivum subsp.spelta*), pp : 12-13.

- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpen J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y and Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-428.

- **BLASZCZYK M., JANIA J.A. and HAGEN J.O. (2014).** Tidewater glaciers of Svalbard: Recent changes and estimates of calving fluxes. *Polish Polar Research* 30 (2):P 85–142.

- **Bouafia, A., and Touati, Y . (2013).** Analyse de la microflore fongique de quelques variétés des semences de blé dans la région de bordj Bou-Arredj. Mémoire de Master, Université de bordj Bou-Arredj, P 2.

- **Bouzerzour, H. (1998).** La sélection pour le rendement en grain, la précocité la biomasse aérienne et l'indice de récolte chez l'orge (*Hordeum vulgare.L*) en zone semi-aride Thèse d'état université, Mentouri Constantine .165 p.

- **Byser. (2001)** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. L'INRAT 74, p:167–186.

C

- **Clement.K.M. (1981).** Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment, IMA Fungus Dec 2(2): P 177-189

- **Castro A. M., Pedro K. C., Cruz J. C., Ferreira M. C., Leite S. G., Pereira N. (2010).** *Trichoderma harzianum* IOC-4038 : a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant b-glucosidase activity from sugarcane bagasse. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162 :2111-2122.

- **Catell, F. (2006).** Fonctionnement hydrique et physiologique de la plante. In: Tiercelin J.R.et Vidal A. *Traité d'irrigation*, 147-161. 2e Ed. Lavoisier. Paris, p 1265.

- **Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L ., Brun S and Penn P. (2002).** Cahier de formation biofarma : les moisissures d'intérêt medical. Labo Analy De biomédicale.

- **Cherfia, R. (2010).** Etude de la variabilité morpho-physiologique et moléculaire d'une collection de blé dur algérien (*Triticum durum Desf.*). Algerie. Université Mentouri, Constantine. 76p.

- **Cook R.J. (1993).** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31:53–80.

- **Chellali, B. (2007).** Marché mondial des céréales: L'Algérie assure sa sécurité alimentaire. <http://www.lemaghreb.dz.com/admin/folder01/une.pdf>

- **Clair, C. (2013).** biodiversité/cycle de vie du blé [en ligne] page consultée le 29/04/2017 <http://acces.ens-lyon.fr/evolution/biodiversite/dossiersthematiques/plantes/poacees/ressources-pour-le-dossier-ble/cyclevie.jpg/view?searchterm=None>

- **CNRS. (2011).** Communiquée de presse [En ligne] sur le thème domestication du blé, quand l'évolution des gènes fait bien les choses. Presse CNRS I T 01 44 96 51 I presse@cnrsdir.fr

- **Daami- Remadi M., El Mahjoub M. (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. L'INRAT 74, p:167–186.
- **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris (FR).p:383.
- **Denis C et Webster I., (1971).** Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma sp* production of volatile antibiotic. Trans. Br. Mycol. Soc. 57, 41-48.
- **Dubos B. (1985).** L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botritis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, p:35-49. INRA, Paris (FR).
- **Duthil, J. (1973).** Eléments d'écologie et d'agronomie, T3, Ed. J.B. Bailli ère. p 654.

E

- **Eliard, J.L. (1979) :** *manuel d'agriculture générale* ; base de la production végétale Ed J-B BAILLIER. P 99.P 388.
- **Evans L.T. et Wardlaw I.F. (1976).** Aspect of comparative physiology in grain yield In: Cereal .Adv.Agr. 28: 301-35.
- **Eziashi E.I., Uma N.U., Adekunle A.A., Airede C.E., (2006).** Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. African Journal of Biotechnology, 5 : 703-706.
- **Ezzahiri, B. (2001).** Les maladies du blé Identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. Transfert de technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA 77, 4 p.

F

- **F.A.O. Stat, (2016)**. Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data>
- **Feillet, P. (2000)**. Le grain de blé composition et utilisation. Ed. INRA, Paris, 308 p.
- **Fernandes, B. (2005)**. Lutte biologique.PHM% Revue horticole, 465, pp.31.
- **Fritas, S. (2012)**. Etude bioécologique du complexe des insectes liés aux cultures céréalières dans la région de Batna (Algérie).thèse de Magister en Ecologie et biologie des populations. Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, p 115.

G

- **Gams, W et Bisett, J. (1998)**. Morphology and identification of *Trichoderma sp.* *Trichoderma & Glioclodium*, Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Londres : Kubicek, C.P. ; Harman, G.E. & Ondik, K.L., CRC Press, 3-14
- **Gams, W., Haekstra, E.S. and Aptroot A. (1998)**. CBS. Course of mycology. Centraalureau voor. Schimmelculture Baarns. The Netherland.
- **Gams, W. and Bissett, J. (2002)**. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E., Eds., *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis Ltd., London, 3-31.
- **Gate P, (1995)**. Ecophysiologie du blé : de la plante à la culture. Ed. Lavoisier. 417 p.
- **Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., (1991)**. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma sp.* *Soil Biol. Biochem.*, 23 : 1011-1020.

H

- **Haliru Musa and Bukola Christianah Adebayo-Tayo. (2012).** Screening of Microorganisms Isolated from Different Environmental Samples for Extracellular Lipase Production AU J.T.15(3): P 179-186

- **Hamel, L. (2010).** Appréciation de la variabilité génétique des blés durs et des blés apparentés par les marqueurs biochimiques. Thèse de Magister en génomique et techniques avancées des végétaux. Université Constantine 1. P 83.

- **Hankin, L., Zucker, M. and Sands, D.e. (1971).** Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 22: 205209.

- **Hennouni, N. (2012).** Evaluation du métabolisme respiratoire et enzymatique des racines de blé dur (*Triticum durum* Desf) issues de plantes infectées par les maladies cryptogamiques et de plantes traitées avec un fongicide (ARTEA EC 330). Thèse de doctorat en Toxicologie Cellulaire. Université Badji Mokhtar, Annaba. P 142.

- **Haran S., Schickler H., Chet I. (1996).** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142 : 232-233.

- **Harman G. E., Howell C. R., viterbo A., Chet I. et Lorito M., (2004).** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews –Microbiology 02, pp: 43-66.

- Hawksworth D.L.; Kirk P.M.; Sutton B.C. and Pegler D.N., (1994).** Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8 th ed . International Mycological Institute, Egham. Unitted .Kingdom.

- **Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. et El Mahjoub M., (2005)** - Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum ;fusarium. sp. radidis-lycopersici* ; Biotechnol. Agron. Soc. Environ.9 (3), 163–171.

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

- **Howell, C. R. (2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87, pp: 04-10.

J

- **Jacquemin, L. (2012).** Production d'hémicelluloses de pailles et de sons de blé à une échelle pilote Etude des performances techniques et évaluation environnementale d'un agro-procédé. Thèse de doctorat en Sciences des Agro ressources. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). P 345.
- **Jelen, S., Ulhoi, B., Larsen, A., Frokiaer, J., Nielsen, S., Rutzler, M. (2013).** AQP9 Expression in Glioblastoma Multiforme Tumors Is Limited to a Small Population of Astrocytic Cells and CD15(+)/CalB(+) Leukocytes. *PLoS One* 8:e75764.

K

- **Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A., (2008)** A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on Agar plates using gram's iodine *Curr. Microbiol.*, 55 , p. 503-507
- **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.

L

- **Lamari L., Bernier CC. And Smith RB., (1991).** Wheat genotypes that develop both tan Necrosis and extensive chlorosis in response to isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Diseases*. Vol 75. 121–122.
- **Leyral G., Joffin J-N. (1998).** *Microbiologie technique* 2^{ème} éd. Bordeaux CRDP, ISBN 2-86617-334-1. P285-297. Chapitre 9. Champignons.

M

- **Magan N and Olsen M. (2004).** Mycotoxines in food: Detection and control. *F.Sc. Technol.* p:190-203.

- **Mahfoud, A. and Lasbuhani, A. (2015).** Approche de la lutte contre les maladies fongiques du blé : étude de l'efficacité de trois molécules antifongiques (in vitro et in situ) et l'effet antagoniste de certains microorganismes fongiques (in vitro). Mémoire de master, Université des frères Mentouri, 14p.

- **Metcalf, D. A. and wilson, C. R., (2001).** The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma Koningii*. *Plant Pathology* 50: 249-257.

- **Mosiniak, M., Prat, R et Claude R. J., (2006).** De blé ou pain. Université Pierre et Marie Curie. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/blepain/1ble/11plant/plante.htm>.

- SANTE CANADA, 2015. Projet de décision d'homologation PRD2015-14, Spiroxamine. www.sc-hc.gc.ca.

- **Moule C, (1980).** Les céréales. Ed. Maison rustique, Paris. 307p.

- **Multon, J.L. (1982).** Conservation et stockage des grains et produits dérivés : oléagineux, protéagineux, céréales et aliments pour animaux, Ed.Tech. Doc et Apria – Lavoisier. Vol II.

N

- **Nadjem, K. (2012).** Contribution à l'Etude des effets du semis direct sur l'efficience d'utilisation de l'eau et le comportement variétal de la culture de Blé en région Semi-aride .Mémoire, Université Ferhat Abbas Sétif, p 7.

O

- **Oliosio A. (2006).** Spatialisation des transferts sol-végétation-atmosphère de l'échelle de la

parcelle à celle du paysage agricole en combinant modèles de fonctionnement de la végétation et du sol, modèles de transfert radiatif et systèmes de mesure de télédétection. Mémoire de HDR, spécialité "Physique de l'Environnement (Sciences de l'eau, Télédétection)", Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon (FRA), p 330.

P

- **Packer H.L. And Thomas C.R. (1990).** Microbiological measurements.
- **Pastre, P. et Roa, L. (1993).** La lutte contre les ravageurs des céréales. Dossier Deltaméthrine. P 163.

R

- **Reino J.L., Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I. G., (2008).** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*, 7 :89- 123.
- **Rifai Ma, (1969).** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116: 1-116.
- **Rifai, (2004).** Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. Paris. P 55-56.
- **Ronald et Atlas. (1997).** Hand book of microbiology media. Edition 2. New york

S

- **Samson R.A., Hoekstra E.S. et Van Oorschot. (1988).** Introduction to foodborne fungi. Edn C.B.S. Amsterdam.
- **Samuels G. J. ; Petrini O. & Manguin S., (1994).** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 1994, 86 : 421-435.
- **Samuels G. J. (2004).** Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma sp.* *Phytopathology*, 94 : P 138-139.

- **Samuels, G., Ismaiel, A., Bon, M., De-Repinis, S., & Petrini, O. (2015).** Trichoderma asperellum sensu lato consist of two cryptic species. Mycologia. Vol., 102 No. 4, pp. 944-966, ISSN 1557-2536.

- **Sayoud R. ; Ezzahiri B. ; Bouznad Z., (1999).** Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb, Guide Pratique. Projet Maghrébin sur la Surveillance des Maladies et le Développement de Germoplasme Résistant des céréales et des Légumineuses Alimentaires. PNUD RAB/91/007 Maroc-Algérie Tunisie. Trames Ed, Algérie.p 64.

http://www.res2.agr.ca/ecorc/personnel/biss_j_f.htm.

- **Shoresh, M., Yedidia, I. & Chet, I. (2005).** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by Trichoderma asperellum T203. Phytopathology 95, 76–84.

-**Singh, RP. Singh, AK. Singh, RN. (2003).** Pathogenic variability in *Alternaria triticina* causing leaf blight of wheat. Ann. Plant Protect. Sci. 11 :309-311.

- **SIVAN, A., CHET, I. (1989).** Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes.

- **Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M and Zid, E.D. (2005).** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (Inrat). Univ. Elmanar. Tunisie.
http://www.johnlibbeyeurotext.fr/fr/revues/agro_biotech/sec/e-docs/00/04/11/2E/

- **Soltner. (1988).** Les grandes productions végétales. Les collections sciences et techniques agricoles, Ed. 16^{ème} éditions, p 464.

- **Suty, L. (2010).** La lutte biologique vers de nouveaux équilibres écologiques. Ed. Educagri. P 44-45.

- **SY (A.A). (1976).** Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Recherche *in Vitro* d'antagoniste dans une perspective de lutte biologique Thèse Doctorat. Ingénieur INPT oulouse, n°534,236p.
www.sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASH8e42/a871ae70,dir/doc.pdf

T

- **Tahir M. ; Ketata H. et Amiri A. (1998)**. Breedin of wheat (*Triticum aestivum L.*) for thermal stress tolerance for continental Mediterranean environments. In: proceeding for of the 9th international wheat genetic symposium .Vol.4. p: 95-97.

-**Tizioualou, G. (2009)**. Recherche de marqueurs de la spécialisation parasites de pyrenophora tritici-repentis (died) Drechs, agent de la tache bronzée sur blé dur (*triticum durum Desf*) et blé tendre (*triticum aestivum L.*). Mémoire de Magister, Ecole EL Harech National Supérieure Agronomique d'EL Harech

- **Tronsmo, A. and Hjeljord, L. (1998)**. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman G. E., Kubiceck C.P. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2, Enzymes, biological control and commercial application, pp.129-151. Taylor and Francis Ltd, London, UK.

V

- **Vinale F, Sivasithamparam K, El G, Ruocco M, Woo S, Lorito M. (2007)** *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. Nat Prod Commun 7:1545–1550.

- **Vincent J.M. and BudgeS.P. (1990)**. Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotiniasclerotiorum*. Mycological Research 94: 607- 612.

Y

- **Yedidia, I., Benhamou,N., Chet, I., (1999)**. Introduction of defense responses in cucumber (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., 65(3), 1061-1070.

Z

- **Zahri S. ; Farih A. ; Badoc A. et Douira A., (2014).** Statut des principales maladies, cryptogamiques foliaires du blé au Maroc en 2013. *Journal of Applied Biosciences* 77, 6543–6549.
- **Zeitoune, R. (2011).** Procédés de fractionnement de la matière végétale, Application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé.37. p : 1-10.
- **Zhihe, C., Qingping, W ; Mifflong, X. (1998).** Advance of biocontrol of *Trichoderma sp* and *Gliocladium*. *J. Microbiol*, 25(5) : 284-286.

ANNEXE

Annexe 1

❖ Préparation des milieux de culture

- Milieu PDA (Ronald et Atlas, 1997) : pH 5.6

Composants	Quantités (g/l)
Extrait de pomme de terre	200
Glucose	20
Agar	20

- Milieu Sabouraud : pH final à 25°C : 5.6

Composants	Quantités (g/l)
Glucose	20
Peptone	10
Agar	20

- Milieu M2 (Almi H., 2015) : pH 5.4

Composants	Quantités (g/l)
Extrait de levure	2
Extrait de Malt	30

Annexe 2❖ **Nombre et pourcentage des différents genres fongiques obtenus à partir de blé dur**

Genre	Nombre	Pourcentage (%)
<i>Alternaria</i>	3	10
<i>Aspergillus</i>	11	34
<i>Botrytis</i>	1	3
<i>Curvularia</i>	1	3
<i>Fusarium</i>	6	19
<i>Mucor</i>	2	6
<i>Penicillium</i>	4	13
<i>Rhizopus</i>	1	3
<i>Trichoderma</i>	2	6
<i>Ulocladium</i>	1	3

Annexe 3

❖ **Diamètres du mycélium des pathogènes en mm après 7 jours d'incubation
(Confrontation direct)**

Isolats fongique	Diamètre moyenne du pathogène en absence d'antagoniste	Diamètre moyenne du pathogène en présence d'antagoniste
<i>Alternaria</i>	80	30
<i>Aspergillus</i>	80	45
<i>Botrytis</i>	80	45
<i>Fusarium</i>	80	40
<i>Penicillium</i>	80	40

❖ **Diamètres du mycélium des pathogènes en mm après 7 jours d'incubation
(Confrontation indirect)**

Isolats fongique	Diamètre moyenne du pathogène en absence d'antagoniste	Diamètre moyenne du pathogène en présence d'antagoniste
<i>Alternaria</i>	80	30
<i>Aspergillus</i>	80	70
<i>Botrytis</i>	80	45
<i>Fusarium</i>	80	60
<i>Penicillium</i>	80	70

Annexe 4

- ❖ Diamètres du mycélium des pathogènes et l'antagoniste « *trichoderma harzianum* »
en mm après 7 jours d'incubation

Isolats fongique	Diamètre du pathogènes
<i>Aspergillus sp</i>	40
<i>Alternaria sp</i>	5
<i>Botrytis sp</i>	20
<i>Fusarium sp</i>	15
<i>Penicillium sp</i>	15

Annexe 5

❖ Préparation des milieux de l'activité enzymatique

- Milieu protéase (Berg *et al.*, 2002).

Composants	Quantités
Agar	13.5g dans 600 ml d'eau distillé
Lait en poudre	10.5g dans 350 ml d'eau distillé

- Milieu cellulase (Kasnaet *al.*, 2008).

Composants	Quantités (g/l)
Cellulose	5
Agar	20

- Milieu lipase (Haliru et Bukola, 2012)

Composants	Quantités (g/l)
Peptone	10
NaCl	5
Calcium chloride	0.1
Agar	20
Rouge Congo	0.5
Tributyryn	1 (ml)

- **Milieu pectinase (Hankinet *al.*, 1971).**

Composants	Quantité (g/l)
Pectine	5
Extrait de levure	5
Agar	20

Contribution à la lutte biologique contre quelques champignons pathogènes isolés à partir du *Triticum durum* (variété CIRTA) par *Trichoderma harzianum* dans la région de Constantine

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie des Fongiques.

Au total, 32 souches fongiques ont été isolées à partir des échantillons de blé dur échantillonnés dans la région d'El Khroub.

La purification et l'identification des isolats ont permis d'obtenir 10 genres fongique à savoir : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, et *Ulocladium*.

Les différents tests d'antagonismes menés *In Vitro* avec *Trichoderma harzianum*, contre cinq isolats pathogènes ont donné des résultats positifs par l'ensemble des méthodes testées (confrontation direct et indirect ainsi que les métabolites secondaires) en moyennant comme souche antagoniste.

Les pourcentages d'inhibitions exécrées par *T. harzianum* dans le cas de confrontation directe ont varié entre 44 et 62% et entre 12 et 63% dans le cas de confrontation indirecte. Tandis que, la plus grande zone de lyse obtenue dans le test des métabolites secondaires a été de l'ordre de 40 mm, obtenue avec le pathogène *Aspergillus sp.*

Les tests d'activités enzymatique de la souche antagoniste, prouve que la souche testée représente une source très importante d'enzymes lytiques à savoir la cellulase, la protéase, pectinase et lipase.

Mots clés : Lutte biologique - Maladies fongiques- Blé dur- *Trichoderma harzianum*- Constantine

Laboratoire de recherche : Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne à Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. DEHIMAL L. (Pr. Univ. des Frères Mentouri Constantine)

Rapporteur : Dr ALMI H. (MCB. Univ. des Frères Mentouri Constantine)

Examineur : Mme ABDELAZIZ O. (MAA. Univ des Frères Mentouri Constantine)

Date de soutenance : 24/06/2018