



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 : Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production
de substances fongiques

Intitulé :

Etude d'antagonisme in vitro de *Trichoderma* sp. vis-à-vis des ravageurs des plantes *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata*

Présenté et soutenu par : *ABDICHE Soumia*

Le : 30/06/2016

KHIREDDINE Imane

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : *Mme BATAICHE Insaf*

Dr.Univ. Des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur : *Mr. DEHIMAT L.*

Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine

Examineur : *Mr. KHOUDJA Youcef*

Dr.Univ. Des Frères Mentouri Constantine

Tutrice : *Mme GHORRI Sana*

Dr.Univ. Des Frères Mentouri Constantine

*Année universitaire
2015 – 2016*

Table des matières

1.Introduction générale.....	1
2.Revue bibliographique.....	3
2.1. Le genre <i>Fusarium</i>	3
2.1.1. Description du <i>Fusarium oxysporum</i>	4
2.1.2. Taxonomie.....	5
2.1.3. Fusariose.....	6
2.1.3.1. Définition.....	6
2.1.3.2. Cycle de développement de <i>Fusarium</i>	7
2.2. <i>L'Alternaria</i>	8
2.2.1. Description du <i>Alternaria alternata</i>	8
2.2.2. Habitat.....	9
2.2.3. Classification taxonomique.....	9
2.2.4. Alternariose.....	9
2.2.4.1. Définition.....	9
2.2.4.2. Cycle de développement de la maladie.....	10
2.3. Moyens de lutte contre les champignons phytopathogènes	11
2.3.1. Moyens de luttés culturaux.....	11
2.3.2. Moyens de lutte physiques.....	11
2.3.3. Moyens de lutte chimiques.....	12
2.3.4. La lutte biologique	12
2.4. Le genre <i>Trichoderma</i>	12
2.4.1 Morphologie.....	13

2.4.2. Taxonomie.....	13
2.4.3. Ecologie.....	16
2.4.4. Pouvoir antagoniste <i>Trichoderma</i>	16
2.4.5. Mode d'action de <i>Trichoderma</i>	18
3. Matériel et méthodes	19
3.1. Isolement et identification de l'agent pathogène.....	19
3.1.1. Isolement de l'agent pathogène.....	19
3.1.2. Purification et conservation des isolats fongiques.....	20
3.1.3. Identification des isolats fongiques.....	20
3.1.3.1. Etude morphologique.....	20
3.2- Isolement et identification de l'agent antagoniste.....	20
3.2.1- Site de prélèvement.....	20
3.2.2- Echantillonnage.....	21
3.2.3- Isolement des antagonistes.....	21
3.2.4- Identification des isolats sélectionnés.....	21
3.2.5- Purification et conservation des isolats.....	21
3.3- Test d'antagonisme.....	22
3.3.1- Antagonisme par confrontation directe.....	22
3.3.2- Antagonisme par confrontation à distance.....	23
4. Résultats et Discussions.....	25
4.1. Isolement et identification de l'agent pathogène.....	25
4.2. Isolement de l'agent pathogène.....	25
4.1.2. Identification des isolats.....	25
4.2. Isolement et identification de l'agent antagoniste.....	27
4.2.1. Isolement de l'agent antagoniste.....	27

4.2.2. Identification des isolats sélectionnés.....	28
4.3 Test d'antagonisme vis-à-vis de <i>Fusarium et d'Alternaria</i>	30
4.3.1. Antagonisme par confrontation directe.....	30
4.2.3.2- Antagonisme par confrontation à distance.....	34
5.conclusion générale et perspectives	39
6 .Résumé.....	41
7. Abstract.....	42
8.ملخص.....	43
9. Références bibliographiques.....	44
10. Annexe.....	44

1- Introduction

Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines des plantes sauvages et cultivées et de causer des dégâts importants. Il s'agit notamment de *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Alternaria* et *Fusarium*; à ce groupe on peut ajouter des Oomycètes tels que *Phytophthora*, *Pythium* et *Aphanomyces*. L'ensemble de ces microorganismes cause des maladies soit de pourriture racinaire soit de flétrissement dû à l'obstruction des vaisseaux conducteurs (Agrios, 2005). Les espèces de *Fusarium* et *Alternaria* provoquent de maladies qui entraînent des pertes économiquement importantes comme le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet chez des plantes cultivées au champs et en serre (Fravel *et al.*, 2003) parce qu'ils regroupent de nombreuses espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses et alternariose) chez de nombreuses plantes. Ils s'attaquent aux cultures telles que le cotonnier (Assigbetsé *et al.*, 1990), le bananier (Moore *et al.*, 1995), le gombo (Drame, 2004), le riz (Zehhar *et al.*, 2006), le blé (Lauzon *et al.*, 2007) et la tomate, (Hibar *et al.*, 2005).

La lutte biologique se considère comme une alternative très prometteuse, à cause de l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes. Ces dernières se caractérisent par leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action ainsi leur persistance dans l'environnement (De Kouassi, 2001). Les micro-organismes utilisés en lutte biologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires. Les champignons et les bactéries sont les micro-organismes les plus utilisés en lutte biologique. Ils ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

Dans cette optique, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se focalise sur " la lutte biologique par l'utilisation de *Trichoderma* contre deux champignons phytopathogènes: *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata*". Cette étude, repose sur plusieurs points importants : (i) L'isolement de l'agent pathogène (le *Fusarium* et l'*Alternaria*), à partir de différentes espèces végétales infectées; (ii) L'isolement , à partir du sol, de l'agent antagoniste le *Trichoderma* ; (iii) La vérification des propriétés antagonistes, de *Trichoderma* par deux méthodes de confrontation: directe et indirecte. La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux champignons d'une manière générale, à l'agent pathogène "*Fusarium* et *Alternaria* " et finalement à l'agent antagoniste étudié dans ce travail *Trichoderma* . La

seconde partie est consacrée au travail expérimental et est basé sur les différentes techniques utilisées et d'une autre partie exposant, comparant et discutant les résultats obtenus.

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et la mise en évidence des perspectives de recherche.

2- Revue bibliographique

La microflore et la microfaune utiles et nuisibles du sol sont très importantes et diversifiées à différents niveaux de profondeur dans le sol. La plupart des micro-organismes sont utiles, tandis que d'autres constituent de véritables ennemis et entravent le développement de la plante et de son système racinaire. Certains agents telluriques phytopathogènes du sol sont responsables d'importantes pertes de récoltes en causant diverses maladies (Agrios 1988). :

- pourriture des semences (*Fusarium spp.*, *Pythium spp.*, etc.),
- fonte des semis (*Pythium spp.*, *Sclerotinia spp.*, etc.),
- pourriture racinaire (*Fusarium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Rhizoctonia spp.*, etc.)
- flétrissement des plantes (*Fusarium spp.*, *Verticillium spp.*, etc.)
- faible production et brûlures des solanacées (tomates, aubergine, pomme de terre..etc.)(*Alternaria spp*)

Dans cette étude, nous allons examiner deux souches de la microflore fongique les plus néfastes dans le domaine agricole ; *Fusarium oxysporum.*, qui cause la **Fusariose**, et *Alternaria alternata*, qui cause l'**Alternariose**.

2.1-Le *Fusarium*

Les souches de *Fusarium* sont, principalement, des phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Les espèces de *Fusarium* sont généralement impliquées dans la pourriture des racines, tiges et fruits ; dans la dégradation du système vasculaire (Trenholm et al., 1988). Le pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux est varié. Certaines espèces sont à l'origine des kératites et endophtalmies. D'autres espèces (*F. solani*, *F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene., 1992).

De nombreuses espèces fusariennes ont été identifiées dans la nature dont les principales capables d'induire la fusariose des graminées et des solanacées: *F. arthrosporioides*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*,...etc. (Xu & Nicholson, 2007). La souche *Fusarium* touche non seulement le règne des *Plantae* mais aussi celui des *Animalae* ;
- *Fusarium verticillioides* est un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran et al., 1989).

- *Fusarium solani* est l'espèce la plus commune, impliquée dans les fusarioses rencontrées aux patients diabétiques. Il peut également être responsable des ulcères cornéens (Gari-Toussaint *et al.*, 1997).

- *Fusarium oxysporum* est un agent d'onxyis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hémopathiemaligne (Thomas et Geraldine ., 1992).

2.1.1-Description du *Fusarium oxysporum*

• Description macroscopique

Dans un milieu de culture solide, comme le milieu PDA, les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier d apparence . Généralement, au début de la croissance, le mycélium aérien est blanc et peut ensuite changer vers une grande variété de couleurs (du violet jusqu' au pourpre foncé) selon la souche de *F. oxysporum* .Si les sporodochiums (amas de conidiophores provenant d un stroma ou masse d hyphes) sont abondants, la culture apparaîtra couleur crème ou orange (Smith *et al.*,1988) (Figure 1).



Figure 1 : caractéristiques macroscopiques de *F. oxysporum* (N. Meddah *et al.*,2006)

• Description microscopique

Fusarium oxysporum produit trois types de spores asexuées: microconidies, macroconidies et chlamydospores. Les microconidies (Figure 2. a) sont uni- ou bicellulaires et sont produites abondamment et fréquemment par le champignon sous tout type de conditions. C'est aussi le type de spore qui est observé plus fréquemment à l'intérieur des vaisseaux des plantes infectées. Les microconidies de *F. oxysporum* ont souvent la forme d'une virgule ou sont ellipsoïdales (Agrios, 2005).

Les macroconidies (Figure 2.b) sont composées de trois jusqu' à cinq cellules, elles sont pointues et courbées jusqu'au bout. Ces spores peuvent être observés dans des sporodochiums à la surface des plantes qui ont été tués par le pathogène (Agrios, 2005). Les chlamydoconidies (Figure 2. c) sont des spores rondes d'une ou deux cellules, entourées d'une paroi épaisse plus ou moins pigmentée. Elles sont observées au milieu des hyphes ou en position terminale, souvent en forme de paires, quelques fois en triplets et rarement en forme rassemblée (Agrios, 2005).

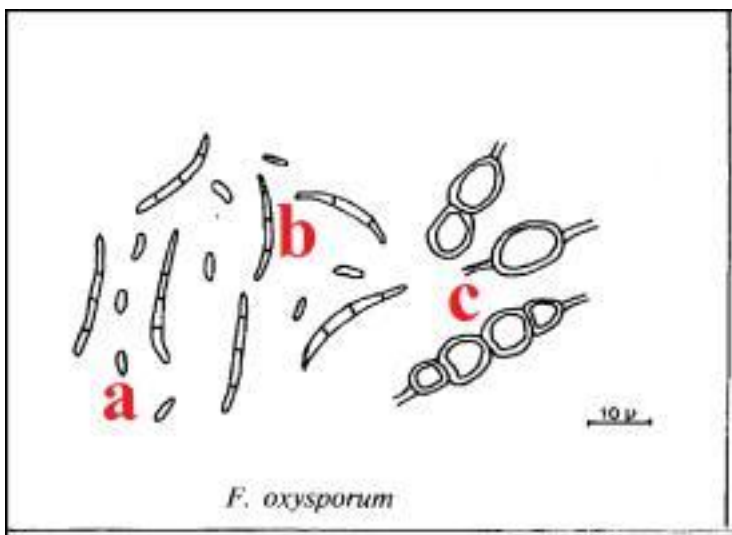


Figure 2 : caractéristiques microscopiques de *F. oxysporum* (Tivoli B.1988). a: microconidies, b: macroconidies, c: clamydospores

2.1.2-Taxonomie

Depuis la création du genre *Fusarium* par Linken1809, et de nombreux travaux ont été consacrés à sa taxonomie (Nelson et al.,1983; in Belabid ,2003).

Le genre *Fusarium* tire son nom du latin *fusus* car ses spores sont en forme de fuseau. *Fusarium oxysporum* et se distingue des autres espèces de *Fusarium* par la production abondante de micro conidies, rassemblées en fausse tête à partir de monophialides courtes. Seule la reproduction asexuée est connue chez cette espèce, ce qui la place dans le groupe des Deutéromycètes

ainsi qu'à la sous classe des Hyphomycètes et à la Famille des Tuberculariacées; il fait partie

de la section *Elegans* (Nelson *et al.*, 1983; Belabid, 2003). Le genre *Fusarium* est économiquement très important car il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes

susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes. Ainsi, plus de 120 formes spécialisées et races ont été décrites chez *F.oxysporum* (Armstrong *et al.* ,1981).De plus beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents sa classifications la suivante (Anaissie, *et al.*,2001)

Règne :	Fungi
Division :	Ascomycota
Classe :	Sordariomycetes
Sous -classe	Hypocreomycetidae
Ordre : Famille	Hypocreales
: Genre :	Nectriaceae
Espèce :	Fusarium
	<i>Fusarium oxysporum</i>

2.1.3- Fusariose

2.1.3.1-Définition

Le Fusariose, maladie causée par un champignon d'origine tellurique *Fusarium sp.*, est responsable de diverses maladies, la principale étant le flétrissement vasculaire caractérisée par un flétrissement des plantes dû à l'envahissement des vaisseaux du xylème par le pathogène.(Prandini *et al.* ,2009)

Les champignons du genre *Fusarium* sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines, dont la présence augmente l'incidence de la maladie sur les productions agricoles (Xu & Nicholson, 2009).

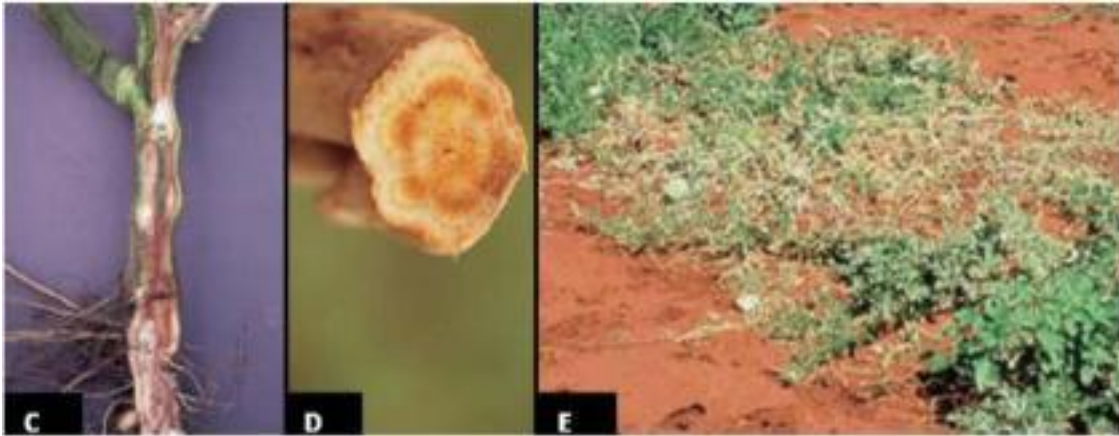


Figure 3: Symptômes de flétrissement vasculaire au *Fusarium oxysporum*: (C) Coloration sévère des tissus au long de la tige d'une plante de tomate infectée. (D) Tissus vasculaires colorés et obstrués en coupe transversale d'une tige de plante de pastèque infecté avec *F. oxysporum* (E) Flétrissement et mort de plante (Agrios, 2005)

2.1.3.2 -Cycle de développement de la maladie

La souche *Fusarium* responsable d'importants dégâts durant tout le cycle vital de la plante hôte, chez les légumineuses, est transmis essentiellement par les semences, mais peut aussi provenir du sol où il se conserve sous forme de spores durables. Parasitant les caryopses, le *Fusarium* peut être présent à la surface, soit à l'état de spores libres, soit sous forme de petites colonies mycéliennes. Plus fréquemment, il est interne et se localise dans le péricarpe ou plus profondément dans les téguments séminaux et l'embryon. Présent autour de ce dernier sous forme de mycélium, les caryopses germent et donnent des plantules qui présentent des faciès caractéristiques durant le cycle vital de la plante hôte (Champion, 1997).

Les plantules détruites par le parasite, en pré-émergence comme en post-émergence, constituent une source de contamination par des plantes voisines, c'est le premier foyer infectieux. En effet, le parasite édifié sur la plantule détruite des coussinets sporifères qui sont les spores entraînées par le vent et par la pluie. Ces spores vont infecter les autres plantes ou contaminer le sol.

Au cours des périodes successives de croissance jusqu'à celles de la reproduction de la plante. Puis la maturité des graines, le *Fusarium*, d'abord localisé au niveau des parties souterraines, se développe et sporule abondamment (Figure 4). Il constitue ainsi un deuxième foyer d'infection qui favorise la dissémination de la maladie aux plantes voisines. La maladie se perpétue, ainsi d'une année à une autre, soit par les caryopses infectés qui hébergent le parasite, soit par les spores formées sur la plante parasitée durant tout le cycle végétatif, soit enfin par contamination du sol (Mrabet, 1998; Caron, 2000).

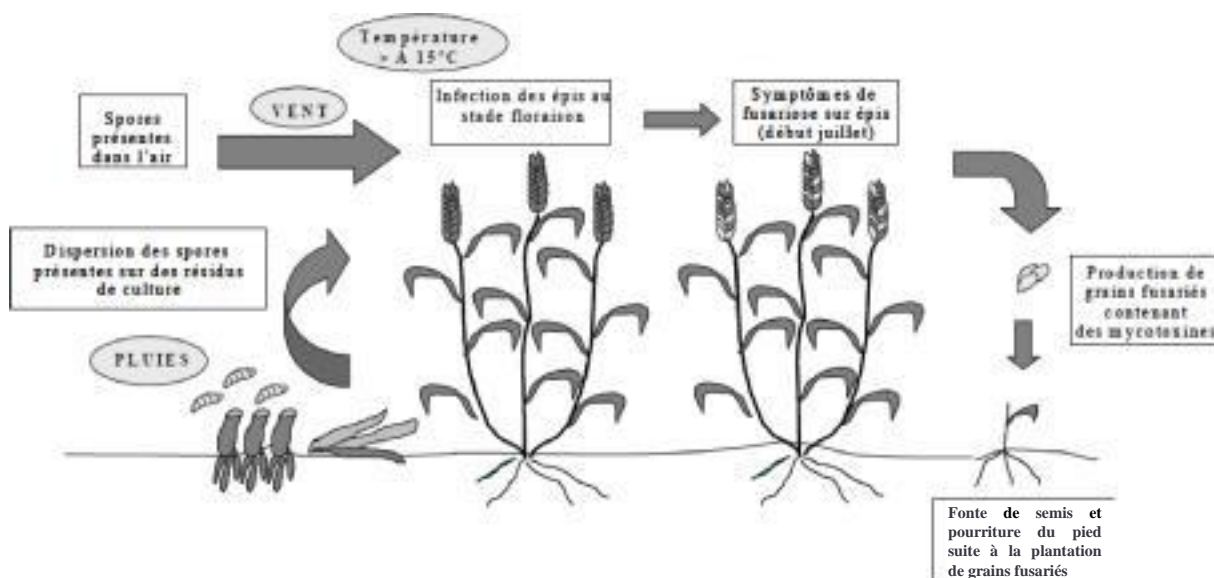


Figure 4: Cycle de développement de la Fusariose (Chen et al., 1994).

2.2-A/ternaria

Le genre *Alternaria* renferme plus de 100 espèces de champignons extrêmement répandues dans l'environnement (Guillemette, 2003). La plupart de ces espèces sont saprophytes, mais d'autres sont pathogènes pour l'Homme, pour les insectes ou pour les plantes (Guillemette, 2003 ; Thomma, 2003). La majorité des espèces du genre *Alternaria* est cependant associée aux plantes ; plus d'une soixantaine, saprophytes ou pathogènes, sont régulièrement signalées sur semences (Champion, 1997).

Les *Alternaria* pathogènes sont généralement inféodés à une famille ou à une espèce donnée. La gamme de plantes hôtes concernées par les attaques d'*Alternaria* est très variée, allant des céréales (*A. triticina*) aux cultures maraichères (*A. dauci* et *A. radicina* sur carotte, *A. solani* sur tomate et pomme de terre, *A. porri* sur poireau, *A. brassicae* et *A. brassicicola* sur radis et chou), aux cultures fruitières (*A. mali* sur pommier, *A. citri* sur citron et orange) ou encore le tabac (*A. longipes*), le coton (*A. macrospora*) ou le lin (Guillemette, 2003).

Par ailleurs, d'autres espèces d'*Alternaria* sont exploitées dans des programmes de lutte biologique. Elles représentent en effet un potentiel en tant que mycoherbicides, notamment *A. alternata* contre *Amaranthus retroflexus* (Lawrie *et al.*, 2000), *A. eichhorniae* contre la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*) (Shabana *et al.*, 1995) ou encore *A. zinniae* contre différentes espèces de *Xanthium* spp. (Nehl et Brown, 2000).

2. 2.1-Description de *A/ternaria a/ternata*

• Description macroscopique

Les colonies d'*Alternaria* ont une croissance rapide et aspect cotonneux. La surface des colonies est souvent hétérogène, présentant des zones blanches constituées exclusivement d'hyphes aériennes et des zones sombres rasantes renfermant les spores asexuées mélanisées. (Criquet *et al.*, 2008) (Figure 5).

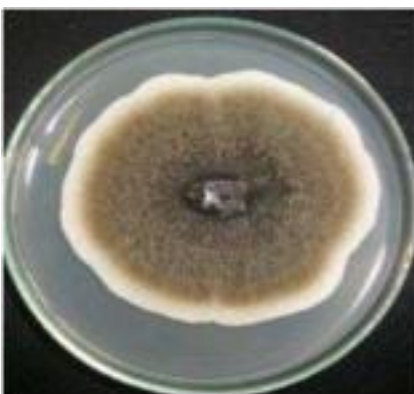


Figure 5: Aspect macroscopique d'*Alternaria alternata*

• Description microscopique

Les hyphes sont septées. Les conidiophores sont bruns, septés et ont souvent l'aspect de « zigzags ». Ils portent des conidies simples ou ramifiées. Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques du genre *Alternaria*. Des tubes germinateurs peuvent également être observés à la surface des conidies principaux champignons allergisants (Criquet *et al.*, 2008) (Figure 6).



Figure 6 :Spore d'*Alternaria alternata* (Criquet *et al.*, 2008)

2. 2. 2-Habitat

Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres : audiovisuel ; bois ; caoutchouc ; matières synthétiques ; papier ; plantes ; produits alimentaires (fruits, légumes, céréales, noix...) ; sol ; textile (coton, jute, laine) .*Alternaria alternata* est également très fréquent. Sa croissance a été mise en évidence sur de nombreux substrats. Plus de 50 % des prélèvements de poussières de matelas de logements humides en contiennent (Botton, 1990).

2. 2.3-Classification taxonomique selon (Hawksworth *et al.*, 1995)

Règne 'Champignons **Division** 'Ascomycota **Classe** ' Euascomycetes **Ordre** 'Pleosporales
Famille ' Pleosporaceae **Genre** '*Alternaria* **Espèce** '*Alternaria alternata*

2.2.4-L'alternariose 1.2.4.1-Définition

L'alternariose Provoquée par *Alternaria* apparaît sous forme de taches concentriques brun foncé et bien délimitées de tailles variables. L'infection s'étend à toute la feuille, la plante finit

par perdre ses feuilles. Les tiges, graines, fruits ou tubercules sont infectés eux aussi et commencent à pourrir. Les facteurs favorisants sont la rosée en plein champ et les gouttes provoquées par la condensation, par exemple sous tunnel plastique. Le champignon se conserve dans le sol sous les débris végétaux sous forme de mycélium, de spores. La dissémination des spores se fait par le vent ou la pluie. Cette maladie peut être transmise par les semences.



Figure 7 : Les symptômes d'Alternariose sur tubercules et feuilles de pomme de terre (Blancard *et al.*, 2012).

2.2.4.2- Cycle de développement de la maladie

Le champignon *Alternaria* passe l'hiver dans les débris contaminés qui se trouvent dans le sol et peut être propagé par des semences contaminées. Durant la saison de croissance, les spores et le mycélium sont disséminés par le vent, l'eau, la pluie et les machines agricoles. L'agent pathogène s'attaque aux vieilles feuilles et la maladie se manifeste plus tardivement que la brûlure cercosporéenne. Les contaminations évoluent lentement jusqu'à ce que les conditions y soient favorables. Quand il fait chaud et humide, les taches foliaires peuvent progresser très rapidement au fur et à mesure que l'agent pathogène se propage (Figure8). Les plantes endommagées et carencées en azote sont plus vulnérables à l'infection (Bélanger M. *et al.*, 2003).

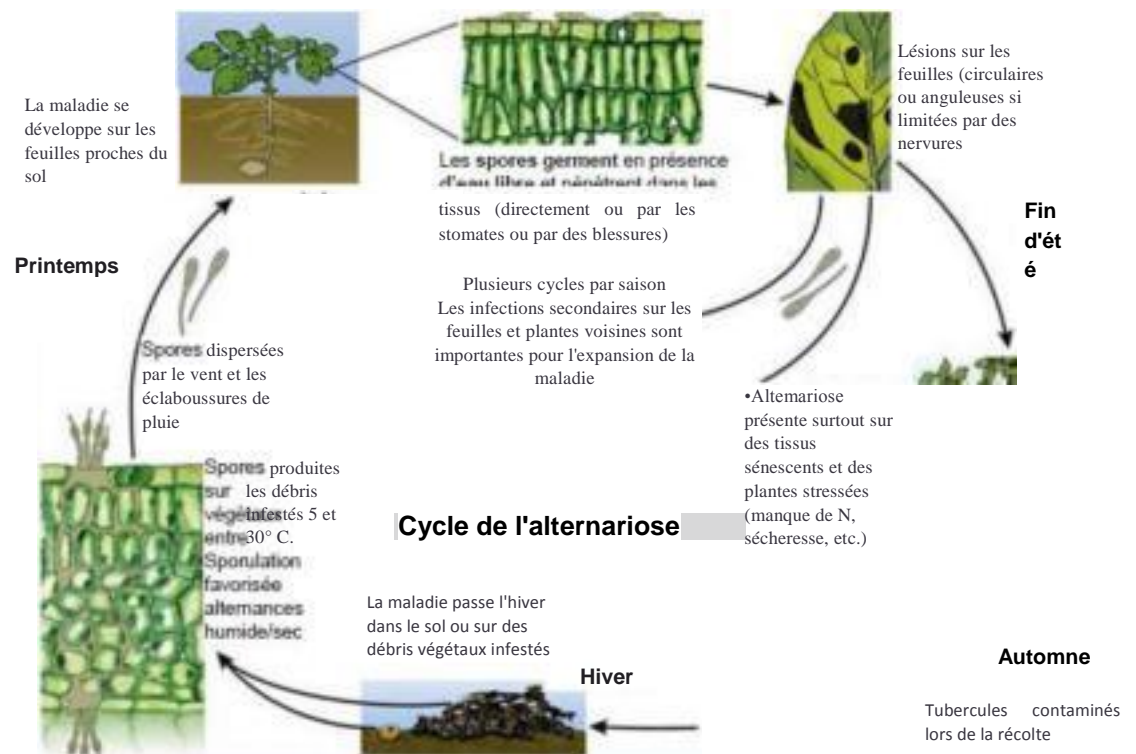


Figure 8: Cycle de développement de l'alternariose (Agrios, 2005).

2.3-Moyens de lutte contre les champignons phytopathogènes

2.3.1-Moyens de luttés culturaux

Les mesures préventives contre la flétrissure consistent à éviter les conditions qui favorisent la maladie soit : un sol léger et acide, un manque d'azote et de calcium, des températures élevées l'optimum pour le développement des champignons pathogènes est 28°C et un manque de lumière en intensité et en temps. (Barna *et al.*,1983) souligne l'importance de maintenir une fertilisation azotée élevée sur tout sous forme de nitrates (fumier) afin de produire beaucoup de pousses jeunes . Des chercheurs de Taiwan (Sunet Huang,1985) ont mis au point un amendement organique et minéral qui à raison de 1% par poids de sol permet de contrôler efficacement divers espèces des champignons

pathogènes . (Bayaa et Erskine ,1998; in Belabid ,2003).

2.3.2- Moyens de lutte physiques

Anchisi *et al.* (1985) ont développé un traitement à l'eau chaude pour protéger les plants dans un sol où l'on sait la maladie présente. La méthode consiste à traiter les racines avec de l'eau à 48-49°C pendant 30 secondes avant de transplanter au moins de 48 heures après. Cela stimule la croissance des racines. La taille des racines amène aussi une protection contre la fusariose pour la même raison. La stérilisation ou la solarisation ne sont pas des solutions à long terme

2.3.3- Moyens de lutte chimiques

Elle est efficace mais présente beaucoup d'effets néfastes, elle se fait par une désinfection du sol à l'aide de fongicides.

Les fongicides les plus usités reste le triazole et ces dérivés qui sont des composés très actifs grâce à leur noyau qui possède une activité pharmacologique, antibactérienne, antifongique et hypoglycémique (Hamoir *et al.*, 2001).

2.3.4- La lutte biologique

Cette méthode consiste à utiliser différents organismes vivants, appelés auxiliaires, ou de leurs produits, pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les bio-agresseurs. Ils 'agit d'utiliser la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles (Fernandes ,2005).

2.4- Le genre *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos, 1985 ; Bissett, 1991). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes». Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Vining, 1990 ; Genilloud *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996).

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide

font des *Trichoderma sp.* des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto *et al.*, 1997). Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) (Roquebert, 1996 ; Cooney *et al.*, 1997 ; Prieto *et al.*, 1997 ; Grondona *et al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek *et al.*, 2003).

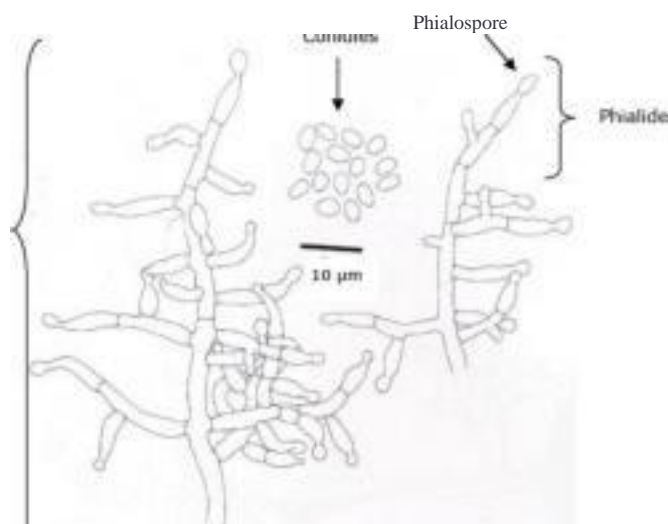
2.4.1- Morphologie

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

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

D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture.

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Figure 9) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores



V

Figure 9 Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels *et al.*, 1994).

(Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek *et al.*, 2003).

2.4.2 Taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de discussions. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett, 1998).

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma sp.*, on se rend vite compte que leur positionnement taxonomique n'a pas été chose facile.

En 1794, Persoon décrit le premier *Trichoderma sp.* et établit 4 espèces.

En 1916, Waksman décrit ce qu'il trouve être 6 nouvelles souches de *Trichoderma sp.* en utilisant des critères macroscopiques, différents de ceux préconisés par Harz.

En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères une fois de plus différents des précédents.

Jusqu'à 1939 le raisonnement d'Abbot reste en vigueur, mais aussi à côté d'identifications totalement indépendantes.

En 1939, Bisby tente de mettre de l'ordre dans ces systèmes en proposant une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Et durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma sp.*

En 1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédant, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales. En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification «utilisable avec le concept d'« espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques. « Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer ». Neuf espèces agrégées sont créées (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai, 1969).

En comparaison avec les nombreux précédents, ce système semble le plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré récemment par Bissett (1984, 1991a et b).

En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma* sp., sans rapport avec les espèces agrégées.

Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtmann, 1996 ; Landreau, 2001).

Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes¹ sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement Lillard-Roberts, 2004 repose sur des comparaisons de l'aspect morphologique, le profil métabolique, l'examen phylogénétique et la séquence d'ADN avec des bases de données de références internes au laboratoire de Bissett (Canada).

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les Ascomycètes (second plus important groupe fongique en nombre d'espèces) du genre *Hypocrea* (Sugiyama, 1987 ; Kubicek *et al.*, 2003).

Sous certaines conditions, méconnues, les *Hypocrea* sp. (téléomorphes) se transforment « définitivement » en *Trichoderma* sp. (anamorphes). On pense alors que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée (Roquebert, 1996).

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma* sp. (Cournut, 1984 ; Sugiyama, 1987).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp. se présente comme suit (selon Bissett, 2004) :

- **Embranchement *Amastigomycota* et/ou *Eumycètes***
- **Sous embranchement *Ascomycotina***
- **Classe *Sordariomycètes***
- **Ordre *Hypocréales***
- **Famille *Hypocraceae***
- **Genre *Hypocrea* mitosporique1 (*Trichoderma*)**

1Groupe important de champignons hétérogènes ayant pour caractéristique commune l'absence de stade sexué (http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).

2.4.3- Ecologie

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

En effet, les *Trichoderma sp.* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la mycoflore terrestre et marine (Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek *et al.*, 2003).

Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau , 2001). L'abondance des *Trichoderma sp.* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Widden et Abitrol, 1980 ; Vining, 1990 ; Kubicek *et al.*, 2003).

2.4.4- Pouvoir antagoniste de *Trichoderma*

Les propriétés antagonistes des *Trichoderma* sont connues depuis longtemps puisque la première publication qui en fait mention date de 1887. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes cultivées n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales. Les modèles étudiés s'intéressaient essentiellement aux parasites du sol mais déjà, en 1952, Wood signalait l'efficacité de *Trichoderma viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue.

La production d'agents de lutte biologique (ALB) à base de *Trichoderma viride* date depuis longtemps et a été révisée au cours des dernières décennies par plusieurs scientifiques qui lui ont attribuée une importance en agriculture pour la lutte contre les maladies causées par les pathogènes. Ce champignon (*Trichoderma viride*) est caractérisé par une croissance rapide, une grande capacité à la compétition saprophytique (Mouria *et al.*, 2005) et parasite le mycélium d'autres champignons. Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes reliées aux sols, aussi bien que pour la dégradation de composés toxiques

présents dans les sols. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation (Harman, 2000). En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont utiles pour la croissance des plantes et leur confèrent une protection contre les pathogènes. Il en résulte aussi une amélioration du contenu du sol en nutriments. La présence de *Trichoderma* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Harman *et al.* 2004; Singh *et al.* 2007).

Il a été prouvé que la souche T-22 de *Trichoderma* est capable d'augmenter le développement des racines chez le maïs et chez d'autres plantes (Harman 2000; Harman *et al.*, 2004). Cet effet peut durer toute la vie des plantes annuelles et peut être induit par l'ajout de petites quantités de bioinoculants à base de *Trichoderma viride* appliqués sur les semences (moins de 1 g/ha). *Trichoderma* est un champignon du sol, filamenteux, connu comme un agent de biocontrôle efficace contre certains pathogènes du sol. Il est l'agent de biocontrôle le plus étudié contre les phytopathogènes. Weindling et Emerson (1936) ont démontré que *Trichoderma* est capable de sécréter une substance extracellulaire, appelée « Gliotoxine », capable de dégrader les pathogènes. *Trichoderma* est un genre de champignon à reproduction asexuée qui se caractérise par des colonies à croissance rapide et colonise les plantes ligneuses et les herbacées. Les *Trichoderma* présentent une diversité génétique très élevée et peuvent être utilisés pour produire des produits à intérêt écologique et commercial marqué. Ils produisent des protéines extracellulaires et sont connus comme meilleurs producteurs d'enzymes dégradant la cellulose et la chitine en plus d'autres enzymes à différents usages qui ont été identifiés (Haran *et al.* 1996; Harman *et al.*, 2004). *Trichoderma viride* est efficace pour le contrôle de *Rizoctonia solani*, un champignon qui cause la fonte des semis et la pourriture des racines, cependant, soixante-dix souches de *Trichoderma* y compris *T. viride*, *T. harzianum* et *T. aureoviride* ont été testés contre le *R. solani* *in vitro* et ont montré une inhibition totale de la croissance de *R. solani*. Les recherches récentes ont prouvé que les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes autant qu'ils sont des parasites pour quelques champignons. Au moins quelques souches établissent une colonisation robuste et durable au niveau des surfaces racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité, la résistance au stress abiotique et l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman *et al.* 2004). *Trichoderma* a été connu comme producteur de substances antibiotiques et parasite d'autres champignons (Lindsey *et al.* 1967; Chang *et al.* 1986). Le parasitisme de *T. viride*, par exemple, est défini par la sécrétion d'un type d'enzyme incluant les cellulases, les chitinases et des antibiotiques, tel que la gliotoxine (Haran *et al.*, 1996). Des récentes recherches ont

montré que *T. viride* est un améliorateur de croissance chez le soja (Harman, 2001), il protège la tomate, le piment (Verma, 2007) et quelques cucurbitacées contre les phytopathogènes. Harman *et al.* (2004) ont ajouté que la colonisation des racines par *Trichoderma* améliore la croissance et le développement de ces derniers, la productivité, la résistance au stress abiotique et le prélèvement et l'utilisation des nutriments. Le maïs répond généralement à l'ajout de fertilisants riches en azote par l'amplification de l'intensité de la couleur verte, une bonne croissance et un rendement maximum. Cependant, les plantes de maïs issues de semences traitées avec *Trichoderma T-22* ont donné un rendement maximum avec un fertilisant contenant 40% moins d'azote par rapport à des semences non traitées avec *T-22* (Harman, 2001).

1.4.5- Mode d'action de *Trichoderma*

Généralement, *Trichoderma* inhibe ou dégrade la pectinase et d'autres enzymes qui sont essentiels pour les phytopathogènes. En plus de son effet inhibiteur des phytopathogènes, *Trichoderma* est aussi capable d'induire une résistance localisée et systématique. L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu soit au niveau de la plante (Lindsey *et al.*, 1967; Yedida *et al.*, 2001), soit au niveau du sol (Chang *et al.*, 1986; Harman, 2000). L'induction de la résistance chez les plantes par *Trichoderma* a été étudiée et comparée avec les réponses induites par les rhizobactéries. *Trichoderma* est résistante aux cyanures et produit deux différentes enzymes qui sont capables de dégrader les cyanures dans la zone racinaire (Ezzi *et al.*, 2002). Par la suite, ce champignon peut augmenter la croissance racinaire, détruit les métabolites toxiques produits par la microflore et contrôle directement les pathogènes des racines. Des observations microscopiques sur des cultures de différents champignons ont montré que *Trichoderma* croît parallèlement avec *Rizoctonia Solani*. Toutefois, *Trichoderma* s'enroule autour du *Rizoctonia solani* et forme des crochets empêchant ainsi le développement de celle-ci (Shalini *et al.*, 2007). *Trichoderma* a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action. Il peut utiliser :

- > **l'antibiose** qui résulte de la production de substances qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène;
- > **la compétition** qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes mais *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables

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

3-Matériel et Méthodes

Le présent travail porte sur la lutte biologique contre l'agent pathogène de la fusariose, "*Fusarium oxysporum*" et de l'aletnariose "*Altenaria alternata*". L'objectif principal de ce travail, est l'isolement de l'agent pathogène à partir de différents organes de plantes infectées, ainsi que l'isolement de l'agent antagoniste à partir du sol agricole.

3.1- Isolement et identification de l'agent pathogène 3.1.1- Isolement de l'agent pathogène

L'isolement de l'agent pathogène **Fusarium oxysporum** a été réalisé à partir des racines de la tomate, tandis ce que L'isolement de l'agent pathogène *Alternaria alternata* a été réalisé à partir des rameaux de l'olivier (figure10



Figure 10: organes des plantes infectés par des champignons phytopathogènes, a: racine de tomate; b: rameaux des oliviers

L'isolement de l'agent pathogène est effectué par la désinfection superficielle des petits fragments de chaque organe endommagé et ce, par trempage dans de l'éthanol absolu pendant cinq minutes. Les organes sont, ensuite, rincés abondamment avec de l'eau distillée stérile, afin d'éliminer les contaminants de l'air (Benhamou *et al.*, 1997).

Après séchage, les fragments sont mis aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), et incubées à 28 °C pendant six jours.

La croissance bactérienne a été inhibée par l'addition de Streptomycine aux milieux de culture à une concentration de 5 mg/l (Botton *et al.*, 1990).

— Purification et conservation des isolats fongiques

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, en réalisant des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de souches pures.

Par ailleurs, la méthode de conservation des souches utilisée, consiste à repiquer les souches en tubes sur gélose inclinée (Botton *et al.*, 1990), les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 28°C, puis stockées à 4°C (Botton *et al.*, 1990).

— Identification des isolats fongiques

3.1.3.1- Etude morphologique

L'identification morphologique des champignons, fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure (Botton *et al.*, 1990).

- Etude macroscopique

Elle permet de déterminer la couleur de la colonie pendant son développement et d'en mesurer son diamètre.

- Etude microscopique

Cette étude permet de détecter la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la reproduction et les caractéristiques des fructifications et des spores (Samson et Haesks, 1988 ; Hawkswarth, 1995 ; Hoog et Gams *et al.*, 1998). Le mycélium est fixé en utilisant une solution contenant 13ml de formaldéhyde (40%) et 5 ml d'acide acétique glaciale, ajouté à 200 ml d'éthanol 50 % (w/v). La préparation est colorée avec du lactophénol bleu coton (Packer et Thomas, 1990).

3.2 - Isolement et identification de l'agent antagoniste

3.2.1- Site de prélèvement

L'isolement de l'agentantagoniste « *Trichoderma sp* » a été réalisé à partir du sol agricole de

Migarine région de Ouargla.

2.3.5- Echantillonnage

C'est avant tout la couche arable qui, du travail du sol et de la fertilisation, est colonisée par le chevelu racinaire des plantes cultivées. C'est donc dans cet horizon de 30 à 40 cm d'épaisseur que l'on recherche généralement les champignons du sol (Davet et Rouxel 1997).

Le sol a été prélevé à l'aide d'une tarière et recueilli dans des sacs en papier soigneusement fermés. L'analyse microbiologique est effectuée dès l'arrivée au laboratoire (Rodriguez- Zaragoza *et al.*, 2005).

2.3.6- Isolement des antagonistes

L'isolement de l'agent antagoniste "*Trichoderma*" à partir du sol est réalisé selon la méthode de suspension-dilution (dilutions plates) (Davet, 1996 ; Davet et Rouxel, 1997).

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter une masse connue de terre (en général 10 g) à 90 ml d'eau stérile, puis à agiter pendant un temps donné (en général 30 mn), ce qui constitue la dilution 10^{-1} . Des prélèvements successifs de 10 ml dans cette suspension, puis dans les suivantes, ajoutés chaque fois à 90 ml d'eau stérile, vont constituer les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , ... jusqu'à 10^{-6} en général. Un volume de 1ml de chaque suspension est déposé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les préparations sont incubées à 28-30°C jusqu'au développement apparent de colonies (Botton *et al.*, 1990).

2.3.7- Identification des isolats sélectionnés

Dans cette partie l'identification est effectuée juste pour les isolats montrant les critères macroscopiques et microscopiques du genre *Trichoderma*.

3.2.5. Purification et conservation des isolats

Les isolats obtenus ont été purifiés par repiquage successif sur le milieu d'isolement (PDA). Les isolats purs sont ensuite, repiqués sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis, pour conservation à 4°C.

3.3- Test d'antagonisme

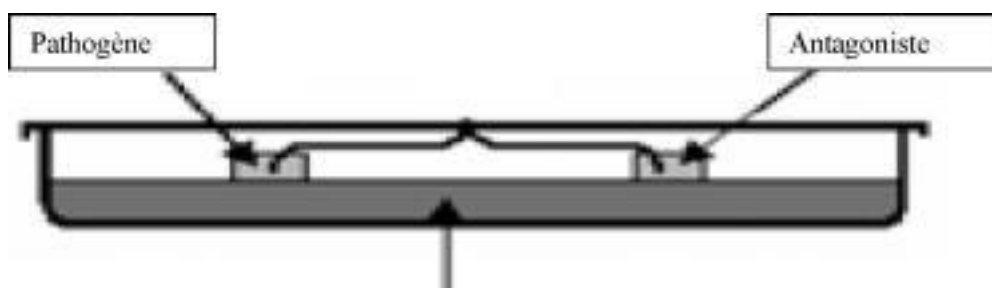
Le test de l'activité antifongique des isolats purifiés consiste à rechercher leur effet antagoniste sur le développement des espèces pathogène de *Fusarium* et d'*Alternaria*.

Pour ce faire, ils ont subis des tests d'antagonismes, en appliquant deux autres méthodes à savoir:

- la confrontation par contacte directe
- la confrontation à distance

3.3.1- Antagonisme par confrontation directe

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant la gélose appropriée, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant l'antagoniste et l'autre le pathogène. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (figure 11) ; les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28 °C pendant six jours (Hibar *et al.*, 2005).



Gélose

Figure 11 Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélosé.

• Evaluation de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne du pathogène est évaluée tous les jours, en mesurant sur le diamètre de la boîte de Pétri, le rayon du pathogène se trouvant à coté de l'antagoniste. Cette évaluation est faite toutes les 24 heures pendant 6 jours.

• Evaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes

L'évaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (Hmouni *et al.*, 1996) selon la formule suivante:

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

Où :

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

C_o est le diamètre moyen des colonies témoins.

Le témoin représente un repiquage du pathogène au centre de la boîte.

Des observations microscopiques relatives à l'effet direct de l'agent antagoniste sur l'état du mycélium du pathogène ont été effectuées.

3.3.2- Antagonisme par confrontation à distance

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et le pathogène en haut (figure 12). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001). Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.

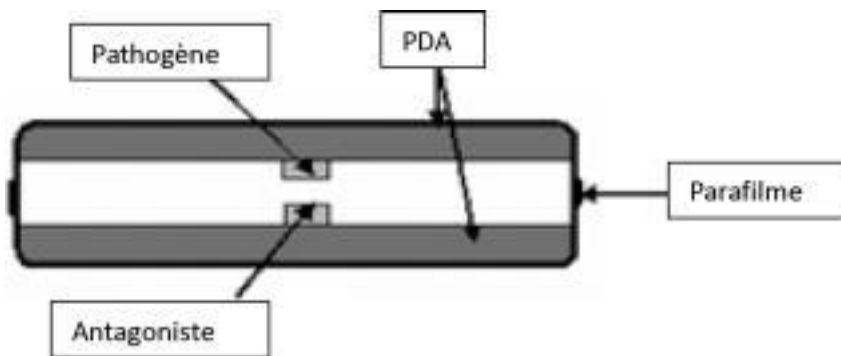


Figure 12 Confrontation indirecte entre le pathogène et l'antagoniste

- **Evaluation de la croissance mycélienne**

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins.

Le témoin est formé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de pathogène, alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA.

- **Evaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes**

L'évaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (Hmouni *et al.*, 1996) selon la formule suivante:

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

4- Résultats et Discussion

Le présent travail porte sur la lutte biologique contre des champignons phytopathogène très répandu en Algérie, le *Fusarium* et *VA* *Alternaria* par l'utilisation d'un champignons antagoniste du genre *Trichoderma*. L'isolement des souches pathogènes est effectué à partir de plantes infectées, tandis que l'isolement de l'agents antagoniste est effectué à partir du sol agricole de la wilaya de Ouargla.

4.1. Isolement et identification de l'agent pathogène

4.1.1. Isolement de l'agent pathogène

L'isolement des agent pathogènes « *Fusarium* » et « *Alternaria* » a été réalisée à partir de différents organes des plantes infectées,

Les cultures réalisées à partir des différents échantillons à savoir: racine de tomate et rameaux des oliviers, ont aboutit à divers aspects, textures et couleurs de colonies. Sur la base des caractéristiques du *Fusarium* et *d'Alternaria* que nous recherchons, deux isolats ont été sélectionnés et purifiés.

En effet, le genre *Fusarium* regroupe différentes espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire les fusarioses, maladie très répandue chez de nombreuses plantes. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers (Dihazi, 2012)..

Les *Alternaria* pathogènes sont généralement inféodés à une famille ou à une espèce donnée. La gamme de plantes hôtes concernées par les attaques d'*Alternaria* est très variée, allant des céréales (*A. triticina*) aux cultures maraichères (*A. dauci* et *A. radicina* sur carotte, *A. solani* sur tomate et pomme de terre, *A. porri* sur poireau, *A. brassicae* et *A. brassicicola* sur radis et chou), aux cultures fruitières (*A. mali* sur pommier, *A. citri* sur citron et orange) ou encore le tabac (*A. longipes*), le coton (*A. macrospora*) ou le lin (Guillemette, 2003).

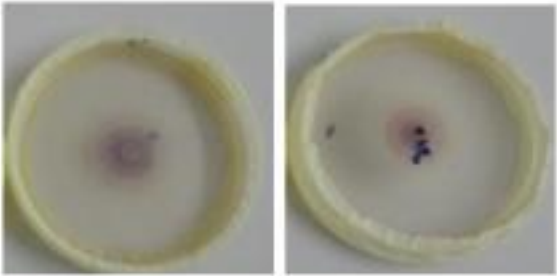
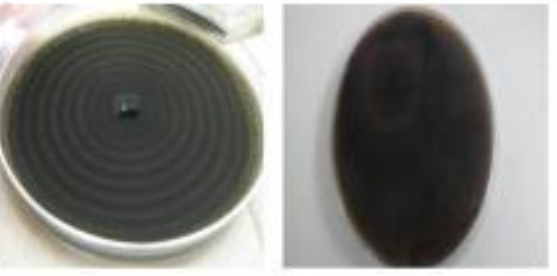
4.1.2. Identification des isolats

• Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des isolats sélectionnés ont été étudiés sur milieu PDA le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le tableau 1 récapitule l'aspect

macroscopique des isolats purifiés: surface et consistance des colonies, couleur du revers de la colonie ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Tableau 1 Observations macroscopiques des différents isolats pathogènes obtenus.

Plante	Observation macroscopique	Caractères macroscopiques
Racine de tomate		colonie aplatie blanche, violette au centre et revers incolore violet au centre
Rameaux des oliviers		- colonie velouté verte olive. - revers vert olive à noire.

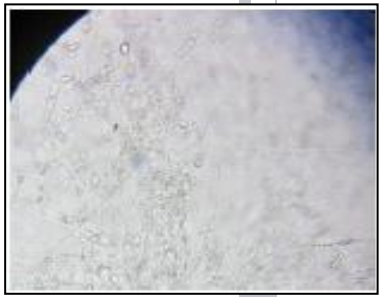

L'étude de Chermette et Bussieras, (1993) a montré que, sur milieu gélosé, les **Fusarium** forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être de couleur crème, rouge à pourpre, lilas ou violet.

Les résultats de recherches faits par Chabasse et son équipe en 2002, montrent que les colonies *dAlternaria* présentent une couleur grise blanche au départ, puis devient foncés (vert à noire) au recto comme au verso.

• Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des isolats pathogènes sélectionnés (conidiophores, conidies, mycélium etc...). Les différents aspects microscopiques des isolats en question, sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2 Description de l'aspect microscopique des isolats pathogènes sélectionnés.

Plante	Aspect microscopique	Caractères microscopiques
Racines de tomate		<ul style="list-style-type: none"> — filament septé, — macroconidies fusiformes, peut ou pas courbées, pluriseptées (3 à 7 septums). — microconodies ovoïdes, 0 à 2 septums, — absence de chlamydozspores
Rameaux des oliviers		<ul style="list-style-type: none"> — filament septé. — macroconidies marrons arrondies à l'extrémité et allongées à l'autre à des cloisons longitudinales et transversales, disposées en chaîne.

Les constatations faites, à partir des études macroscopiques et microscopiques, nous ont orienté vers le genre *Fusarium* et *Alternaria* et ce, pour les isolats phytopathogènes obtenus. Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées. En effet, le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau (Tabuc, 2007).

Alors que les études de Chabasse et al. en 2002, montrent que les conidies d'*Alternaria* sont brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important. Ce sont des dictyospores. A maturité, elles présentent à la fois des cloisons transversales, obliques ou longitudinales. Ces spores à parois lisse et de taille importante . sont souvent disposées en chaînes.

4.2. Isolement et identification de l'agent

antagoniste 4.2.1. Isolement de l'agent antagoniste

L'isolement des antagonistes, réalisé selon la méthode de suspension- dilution (dilutions plates), a aboutit à la sélection d'un isolat présente les caractères macroscopique et microscopiques de *Trichoderma* .

4.2.3.3- Identification des isolats sélectionnés

L'identification des moisissures sélectionnées a été faite par une analyse des critères macroscopiques et microscopiques.

* Critères d'identification macroscopique

Les caractères macroscopiques des différents isolats sélectionnés ont été étudiés sur le milieu PDA. La figure 13 présente l'aspect de la colonie purifiée: surface et consistance, couleur du revers de la colonie ainsi que la présence ou l'absence de pigments

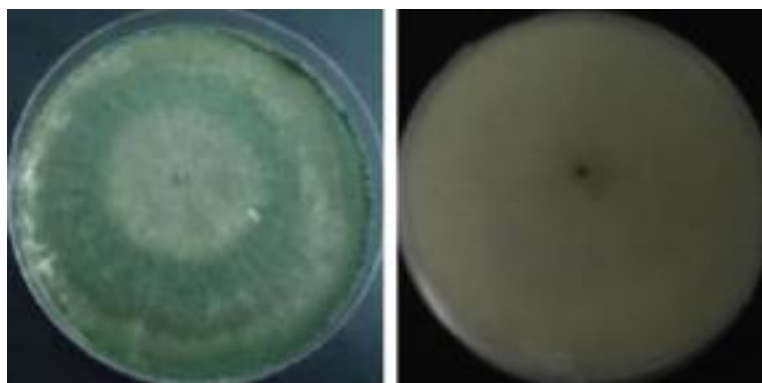


Figure 13 : observation macroscopique du *Trichoderma sp.*

Les isolats antagonistes sélectionnés, sur gélose PDA, montrent une croissance rapide et extensive, avec un aspect laineux de couleur blanche au départ, puis verte avec le temps. Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek *et al.*, 2003, ont montrés que l'aspect macroscopique des *Trichoderma sp.* 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. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16ème et le 20ème jour un feutrage épais se superpose à la culture.

• Critères d'identification microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques de la souche fongique sélectionnée. la figure 14 résume les différents caractères microscopiques observés.

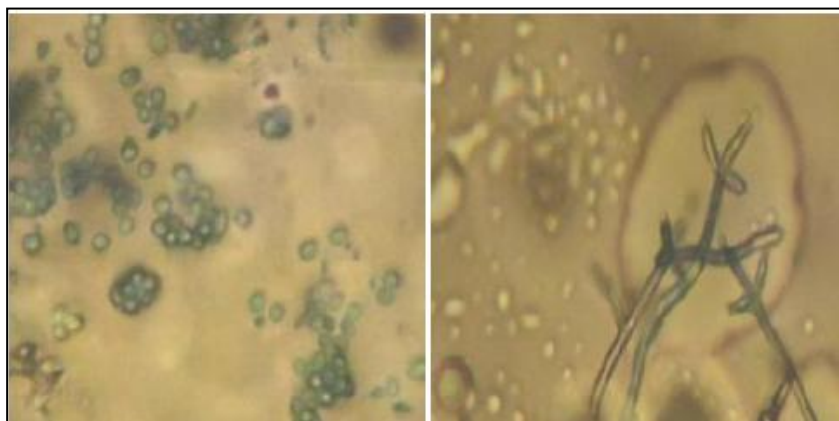


Figure 14 : observation microscopique du *Trichoderma sp.*

Sous microscope, les hyphes de la souche sélectionnées sont septés, hyalins, avec des petits conidiophores bien différenciés, portant des phialides en forme de quille.

Selon Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek *et al.*, 2003, la souche *Trichoderma* sous microscope optique a un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés et parois lisses. Les conidiophores 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 (phialospores ou bien conidies).

D'après les observations macroscopiques (aspect, couleur et vitesse de croissance des colonies) et microscopiques (nature du filament, présence de conidiophores et forme des conidies), il a été constaté que la souche antagoniste sélectionnée appartient au genre *Trichoderma*.

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998). Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998).

4.3 Test d'antagonisme vis-à-vis de *Fusarium* et d'*Alternaria*

La mise en évidence de l'activité antifongique des purifiés consiste à rechercher leur effet antagoniste sur le développement des espèces de *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata* isolées. En effet, cette étude a été faite *in vitro* selon deux méthodes à savoir: la confrontation par contacte directe et la confrontation à distance.

4.3.1. Antagonisme par confrontation directe

Les résultats de la confrontation directe entre la souche *Trichoderma* et les deux souches pathogènes, montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante en comparaison à ceux obtenus avec les différentes confrontations (Pathogène - Antagoniste).

Après 4 jours d'incubation, *Trichoderma* a montré une bonne activité inhibitrice vis à vis les souches pathogènes test et ce, par l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour l'ensemble des souches pathogènes. Les figures 15, 16; 17 et 18 montrent l'inhibition de croissance de *F.oxysporum* et *A.alternata* par la souche *Trichoderma sp.*

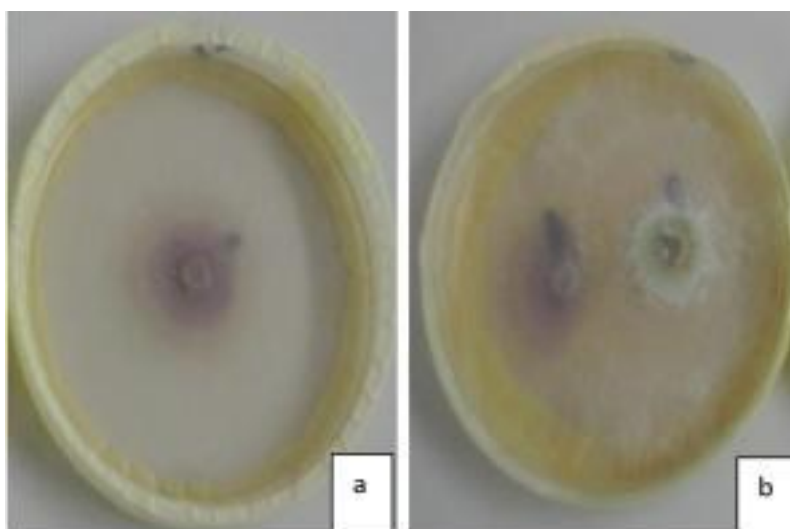


Figure 15 Inhibition du développement de *Fusarium* par *Trichoderma*. a: témoin, b: avec l'antagoniste

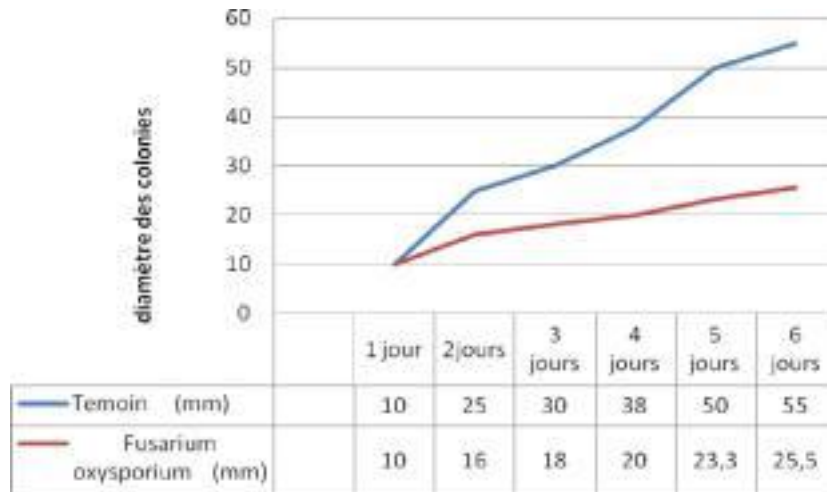


Figure 16 : Diamètre des colonies de *Fusarium oxysporum* en présence de *Trichoderma sp.* par confrontation indirect, après six jours d'incubation à 25°C comparativement au témoin

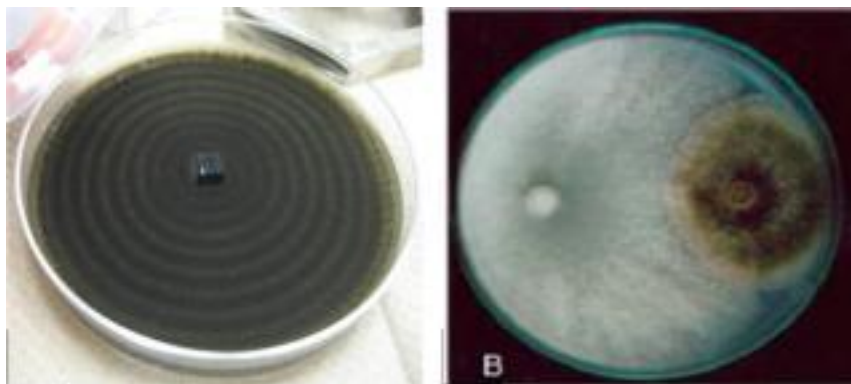


Figure17: Inhibition du développement d'*Alternaria* par *Trichoderma sp.*, a: témoin b: avec l'antagoniste.

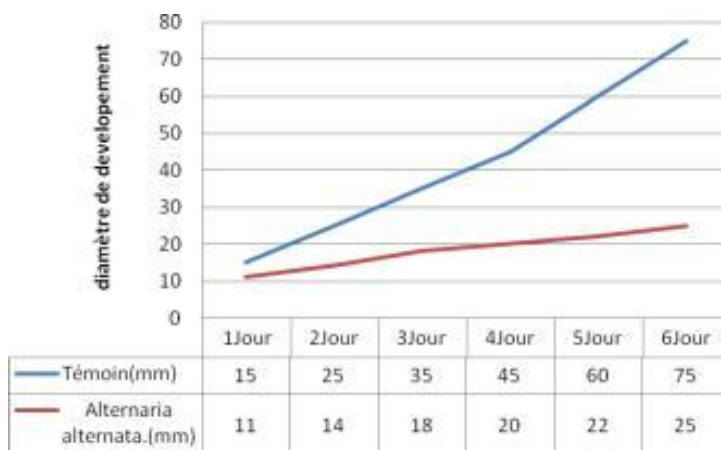


Figure 18 :Diamètre des colonies d*Alternaria alternata* en présence de *Trichoderma sp* .par confrontation direct. après six jours d'incubation à 25°C comparativement au témoin.

Les résultats montrent qu'au bout de quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, alors que les isolats de pathogènes n'occupent qu'une surface variant de 20 à 25 mm de diamètre, ce qui correspond à une inhibition de croissance mycélienne supérieure à 50 %. Le témoin des souches pathogènes cultivé seul, occupe une surface variant de 55 à 75 mm de diamètre (figure 16 et 18). En effet, le calcul du taux d'inhibition montre que toutes les souches de pathogènes sont inhibées à plus de 50% (figure 19).

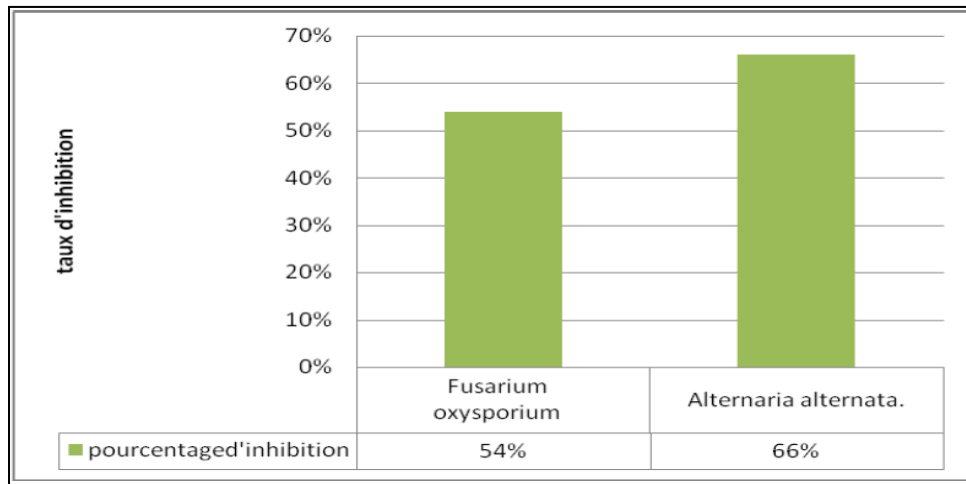


Figure 19 : Estimation des pourcentages d'inhibitions des souches pathogènes par *Trichoderma sp*
Confrontation directe.

D'un autre côté, les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre la souche antagoniste et les pathogènes, montrent un enroulement du mycélium d'antagoniste sur celui du pathogène (figure 20 et 21). Cette action est expliquée selon Benhamou, Daami-Remadi,

2001 et Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001, par un pouvoir hautement myco-parasitaire de la souche antagoniste *Trichoderma sp.*

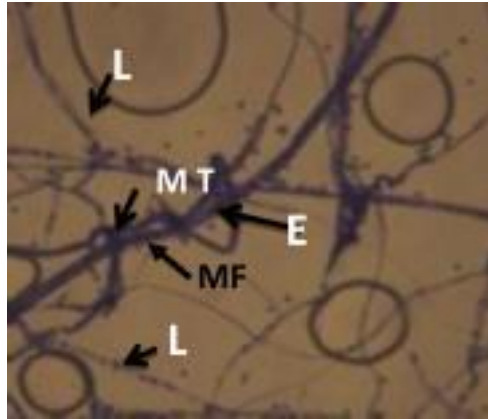


Figure 20 Observation microscopique de la zone de contact entre *Fusarium* et *Trichoderma*. MA. Mycélium de l'antagoniste, MF. Mycélium de *Fusarium*, E. Enroulement, L. lyse de Mycélium

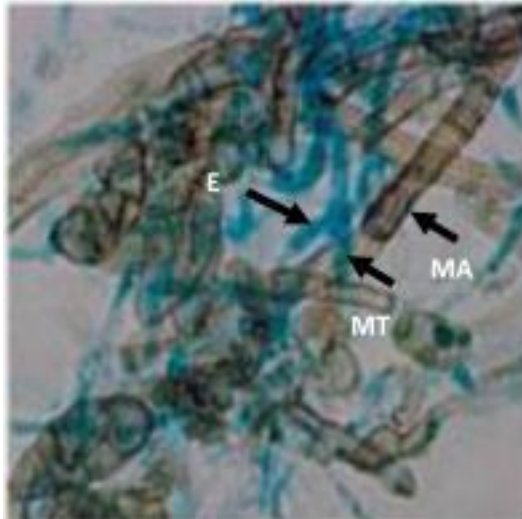


Figure 21: Observation microscopique de la zone de contact entre *Alternaria* et *Trichoderma*. MT.

Mycélium de *Trichoderma*, MA.

Mycélium d'*Alternaria*, E. Enroulement

L'envahissement du mycélium du pathogène par *Trichoderma* a été également observé par Benhamou et Chet (1997) en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture entre cet antagoniste et un autre champignon tellurique, le *Pythium ultimum* et ce, au bout de quatre à cinq jours après l'inoculation.

D'après Davet, (1983) et Meslouhi, (1989), cette action inhibitrice est due à des substances, de nature chimique, libérées par les souches de *Trichoderma* (phénomène d'antibiose). La capacité à produire de telles substances varie selon les isolats d'une même espèce ou d'espèce différente.

En plus de son action parasitaire, *Trichoderma* se développe plus rapidement par rapport au pathogènes en colonisant le milieu nutritif et en ravissant les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition (Alabouvette *et al.*, 1983 ; Dubot, 1985 ; Davet, 1996).

L'activité antifongique, observée par la souche de *Trichoderma*, peut être due à la production d'enzymes extracellulaire. **Ces enzymes sont responsables de la dégradation des parois cellulaires des agents pathogènes** (Lorito *et al.*, 1993). Diverses études ont expliqué l'abondance des espèces de *Trichoderma* dans les écosystèmes, par leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes, ils sont de ce fait, un maillon important dans les chaînes biologiques (Widden et Abitrol, 1980 ; Vining, 1990; Kubicek *et al.*, 2003). De leurs côté, Elsas *et al.*, (1997) considère *Trichoderma* comme un ascomycètes cellulolytiques.

L'activité mycoparasitaire de *Trichoderma spp.* contre les sclérotes des champignons phytopathogènes est considérée comme un outil puissant pour la lutte biologique, puisque ces structures végétatives, très résistantes, représentent la forme de survie primaire du pathogène dans le sol (Fang *et al.* 2005, St Leger et Wang 2010, Sandhu *et al.* 2012).

Catalano et ses collaborateurs, (2007) ont étudié l'interaction parasite, établie par *Trichoderma*, contre les champignons phytopathogènes par analyse histologique et biochimique. Plusieurs activités enzymatiques ont été liées au mycoparasitisme, tels que les enzymes dégradant les composants de la paroi cellulaire à savoir, la chitinase, la cellulases, la lipase et la protéase ou des composés phénoliques, la laccase dégradant la lignine et la mélanine.

4.2.3.2- Antagonisme par confrontation à distance

Les résultats obtenus de cet essai montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de *Fusarium* et d'*Alternaria* exercé par la souche antagoniste de *Trichoderma* comparativement aux témoins. Il ressort de ce résultats, que malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats pathogènes et l'antagoniste testé, ce dernier a pus exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies des pathogènes. Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de *F.oxysporum* et *A.alternata* cultivés en présence et en l'absence de l'antagoniste (Figures de 22 à 25).

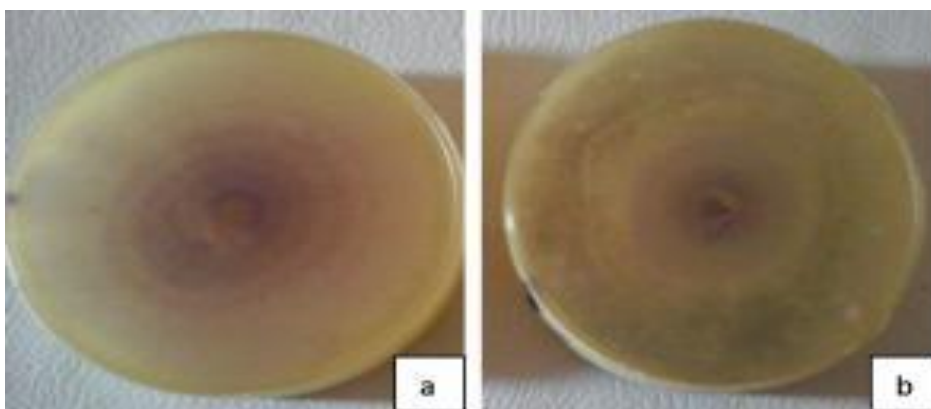


Figure 22 : effet inhibiteur par confrontation indirecte du *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum*. a: témoin; b: avec l'antagoniste

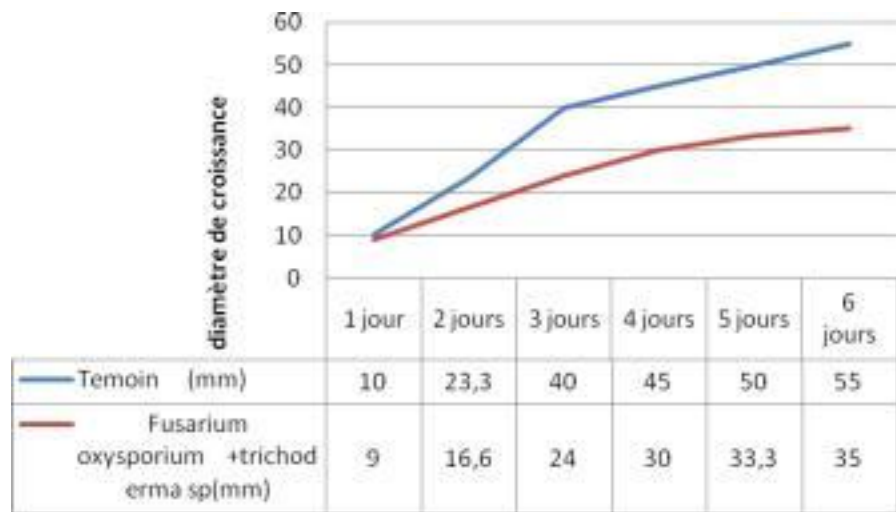


Figure 23: Diamètre des colonies de *Fusarium oxysporum* en présence de *Trichoderma sp* .par confrontation indirect. après six jours d'incubation à 25°C comparativement au témoin

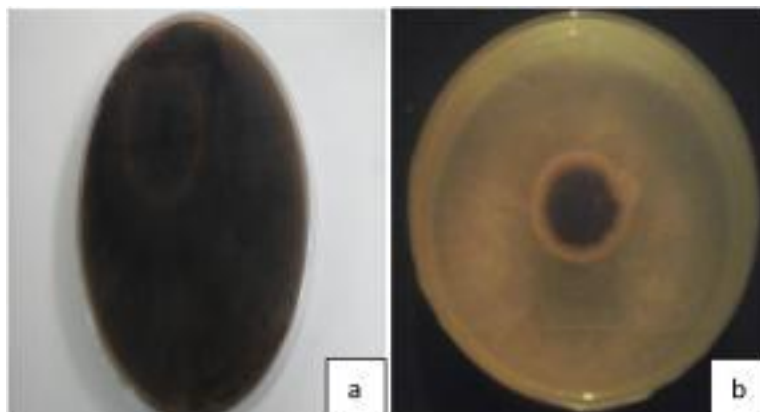


Figure 24: effet inhibiteur par confrontation indirecte du *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne d'*A.alternata*. a: témoin; b: avec l'antagoniste

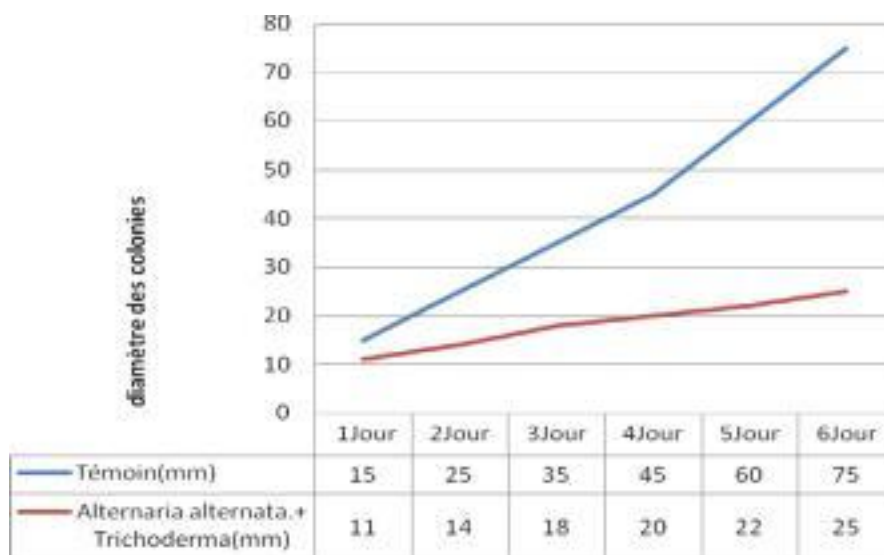


Figure 25: Diamètre des colonies d'*Alternaria alternata* en présence de *Trichoderma sp.* par confrontation direct. après six jours d'incubation à 25°C comparativement au témoin.

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance du *Trichoderma sp.* exercé sur les isolats de *F. oxysporum* et *A.alternata* ; cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies des pathogènes cultivés en présence et en absence de l'antagoniste. (figures 23 et 25).

Les résultats obtenus montrent une nette réduction du diamètre moyen des colonies des pathogènes en présence de *Trichoderma* par rapport au témoin non traité. Après six jours d'incubation à 28 °C, cette réduction atteint 35 mm pour l'isolat *F. oxysporum* traduisant une inhibition de l'ordre de 36 % et 25mm pour la souche *A.alternata* traduisant une inhibition de l'ordre de 62% (figure 26).

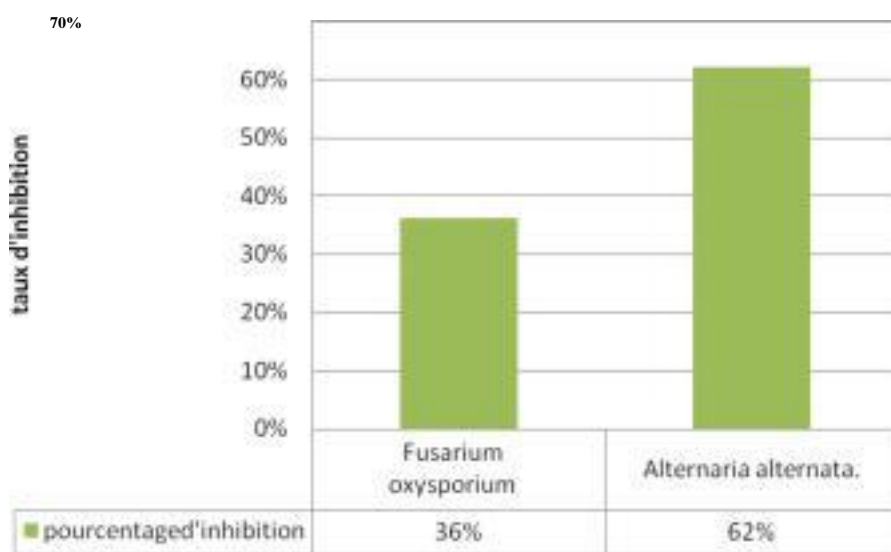


Figure 26: Estimation des pourcentages d'inhibition des souches pathogènes par *Trichoderma sp.* confrontation indirecte.

Dans ce même sens, Daami-Remadi (2001) a montré l'effet fortement antagoniste du même isolat de *T. harzianum* vis-à-vis des *Fusarium* responsables de la pourriture sèche sur des tubercules de pomme de terre. Cette inhibition était plus marquée (près de 93 %) si l'antagoniste était apporté sous forme d'une suspension de spores dans le milieu de culture. D'après Dennis et Websters, (1971) les *Trichoderma* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous formes des substances volatiles importantes. Ces mêmes résultats ont été remarqués, par Hibar *et al.* (2005). Ces auteurs ont expliqué l'aptitude de *Trichoderma* à produire des substances volatiles, capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène.

Il a été démontré que *Trichoderma spp.* se trouve généralement dans tous les types de sols, y compris les sols agricoles (Roiger *et al.*, 1991). Plusieurs espèces de *Trichoderma* réduisent l'infection des agents pathogènes des plantes transmises par le sol (Sivan et Chet, 1986; Calvet et Berra, 1990; Spiegel et Chet, 1998; Elad, 2000). *Trichoderma harzianum* est un agent de lutte biologique efficace utilisé dans le commerce, contre les champignons pathogènes telluriques (Shalini *et al.*, 2006). Siddique *et al.*, (2001) a rapporté que cinq espèces de *Trichoderma* considérablement réduisent la population de nématodes dans le gombo et de haricot mungo.

La production de métabolites secondaires par différentes espèces de *Trichoderma* est bien documentée. Il a été rapporté que *Trichoderma spp.* produisent une large gamme de volatils et non volatils substances antibiotiques (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998, Vyas et Mathur, 2002).

Sept *Trichoderma sp.* ont été évalués pour l'activité antagoniste contre *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia sp.* et *S. rolfsii* et la présence de métabolites diffusibles dans le milieu a été démontrée dans près de 80% de l'interaction Antagoniste pathogène (Monaco *et al.* 1994). Une souche de *T. harzianum* isolée à partir de racines de blé a produit cinq différents métabolites, parmi eux, trois nouveaux composés présentent une activité antifongique contre *G. graminis var. tritici*, l'agent causal de piétin-échaudage du blé (Ghisalberti et Rowland, 1993). Les isolats de *T. viride* *T. harzianum* ont été inhibés la croissance de *Fusarium moniliforme* et *Aspergillus flavus* par la production de composés volatils inhibitrices (Calistru *et al.* 1997). Maladie coton de semis incitée par *R. solani* a été supprimée par *T. viride* en raison de mycoparasitisme et la production d'antibiotiques (Howell *et al.* ,2000). Les métabolites secondaires volatils produites par *Trichoderma pseudokoningii*, *T. viride* et *T. aureoviride* affectent la croissance du mycélium et la synthèse des protéines dans deux isolats de *Serpula lacrymans* à des divers degrés (Humphirs *et al.* 2002). Mais la production de métabolites non volatils semble être l'un des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique de l'agent pathogène des racines de tomate *Pyrenochaeta lycopersici* par quatre *T. harzianum* différents isolats en plus de la grande sécrétion de chitinases (Perez *et al.*, 2002).

Trichoderma possède une batterie de mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes (Gaigole *et al.* 2011, Bhale *et al.* 2013 et Khang *et al.* 2013). Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. Il peut utiliser également :

La compétition, qui se manifeste par l'aptitude de l'antagoniste à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes, cette action est observée par la technique de confrontation sur milieu gélosé, où le *Trichoderma* colonise le milieu de culture en épuisant le milieu de culture (Alabouvette *et al.*, 1983 ; Dubot, 1985 ; Davet, 1996).

En analysant, microscopiquement, la zone de contact entre l'agent pathogène et l'antagoniste pendant le test d'antagonisme par confrontation directe, un enchevêtrement est observé entre l'action de **mycoparasitisme** qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque le *Trichoderma* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur, et l'action d'**antibiose** qui se manifeste par l'injection des substances (enzymes ou antibiotiques) qui détruisent le mycélium de pathogène (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001, Howell, 2003, Fang *et al.* 2005, St Leger et Wang 2010, Sandhu *et al.* 2012).

5- Conclusion générale et perspectives :

Le présent travail été dans la conception de la lutte biologique contre les champignon phytopathogène "le *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata*".

En effet, 1 champignon du genre *Fusarium* et un autre du genre *Alternaria*, ont été isolés à partir de différents organes de plantes infectées.

L'identification de espèces pathogènes a été effectuée selon les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques, au sein du laboratoire du LaMyBAM (Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne).

L'isolement de champignon antagoniste du genre *Trichoderma*, a été réalisé à partir du sol agricole de la wilaya de Ouargla au Sud Algérien.

L'identification morphologique a été effectuée au sein du laboratoire du LaMyBAM.

L'effet de l'activité antagoniste de la souche *Trichoderma* contre les 2 espèces du *Fusarium* et *Alternaria* en question, a été étudié selon deux méthodes, confrontation directe et indirecte. Les résultats de la confrontation directe montrent un pourcentage d'inhibition varie de 54% à 66% selon les espèces pathogènes testées, alors que les résultats de la confrontation à distance montre des forts pourcentages d'inhibition varient de 32% à 66%.

En résumé, les résultats de cette modeste recherche nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance du potentiel antagoniste de *Trichoderma* à l'égard des souches de *Fusarium* et *Alternaria* testées.

En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial de fixer les points suivants comme perspectives:

- L'élongation des test des *Trichoderma* isolées sur une gamme plus large des *Fusarium* et d'*Alternaria* pathogènes.
- Tester l'effet *in vivo* des souches *Trichoderma* isolées sur la croissance des *Fusarium* et d'*Alternaria* pathogènes .
- la confirmation de l'identification des souches isolées (pathogènes et antagoniste) par vois moléculaire
- La production et l'identification des métabolites bioactifs de *Trichoderma* isolée, par HPLC et spectrométrie de masse.
- Le test de l'activité antagoniste des métabolites bioactifs de *Trichoderma* isolée *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.

6- Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre le champignon phytopathogène "le *Fusarium oxysporium* et *Alternaria alternata*".

Les champignons du genre *Fusarium* et *Alternaria* , ont été isolés à partir de tomate et l'olivier infectées. L'identification du gcnrg. a été effectuée selon les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques..

La lutte biologique contre ces phytopathogènes, est mise en évidence en utilisant la souche du genre *Trichoderma* isolée à partie du sol agricole de la wilaya d'Ouargla au Sud Algérien, les essais de confrontation directe et à distance, sur milieu de culture, entre les souches pathogènes et *Trichoderma sp* ont révélé que ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* et de *Alternaria alternata* de plus de 50 % par rapport au témoin et ce après quatre jours d'incubation à 28 °C en confrontation directe. De plus, au delà de cette période et au terme de six jours, le *Trichoderma sp.* envahit les colonies pathogènes sur lesquelles il sporule même, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. Alors que les résultats de la confrontation à distance montrent des pourcentages d'inhibition considérables varient de 36% avec le *Fusarium oxysporum* à 62% avec *Alternaria alternata* et ce après six jours.

Mots-clés. *Trichoderma sp.* ; *Fusarium oxysporum*; *Alternaria alternata* ; lutte biologique ; antagonisme.

7. Abstract

This study was conducted in order to fight against the pathogenic plant fungus "*Fusarium oxysporium* and *Alternaria alternata*".

The fungi of the genus *Fusarium* and *Alternaria* were isolated from infected tomato and olive. gender identification was carried out according to the macroscopic and microscopic morphological characters. .

Biocontrol against plant pathogens such, is demonstrated using the strain of the genus *Trichoderma* isolated from agricultural soil of the province of Ouargla in southern Algeria

The tests of direct comparison and distance on culture medium, between pathogenic strains and *Trichoderma sp* revealed that he was able to inhibit mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* of more than 50% compared with the control and after four days incubation at 28 ° C in direct confrontation. Moreover, beyond this period and after six days, the *Trichoderma sp.* invading pathogens colonies on which sporule same, revealing its power highly myco-parasitic. whereas the results of the remote confrontation show considerable inhibition percentages vary from 36% with the *Fusarium oxysporum* 62% with *Alternaria alternata* and after six days.

Keywords: *Trichoderma sp.*; *Fusarium oxysporum*; *Alternaria alternata*; biological control ; antagonism.

8'. الملخص

ان هذه الدراسة قد تمت في اطار المكافحة البيولوجية ضد الفطريات المسببة للأمراض النبات من نوع *Fusarium*. وقد تم عزل عزلتين من جنس *Fusarium* و *Alternaria* من مختلف النباتات المصابة. وقد أجري تحديد الجنس باستخدام الصفات المورفولوجية.

في اطار المكافحة البيولوجية ضد مسببات الأمراض النباتية المذكورة اعلاه، تم عزل سلالة من جنس *Trichoderma* من التربة الزراعية الجزائرية لولاية ورقلة.

. في نفس الاطار، تم دراسة تأثير النشاط الحيوي من سلالات *Trichoderma* على أنواع *Fusarium* و *Alternaria* المعزولة وفقا طرق المواجهة المباشرة وغير المباشرة. نتائج المواجهات المباشرة تظهر نسب تثبيط تتراوح من 50٪ إلى 66٪ حسب الأنواع السلالات المسببة للأمراض و سلالات الخصوم المختبرة ، في حين أن نتائج المواجهة غير المباشرة تكتف نسبة تثبيط معتبرة مقارنة تتراوح بين 38٪ مع *Fusarium* إلى 66٪ مع *Alternaria* تختلف باختلاف نوع السلالة الممرضة والمكافحة المختبرة.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium*, المكافحة البيولوجية, *Trichoderma*, *Alternaria*.

9. Références bibliographique

- Agrios, G.N.,(1988). Plant pathology.3edit, academic press,NewYork 529 p.
- Agrios, G.N., (2005). Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495. pp. 524-525 , 539.
- Alabouvette C., Couteaudier Y. et Louvet J., (1983). Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16. XXIV.
- Anaissie,E. J, R. T. Kuchar, J. H. Rex, A. Francesconi, M. Kasai, F. M. C. Muller, M. Lozano-Chiu, R. C. Summerbell, M. C. Dignani, S. J. Chanock, and T. J. Walsh.,(2001).
« Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. », dans Clin Infect Dis.,vol. 33 pages =1871-1878.
- Anchisi, M., Gennari, M., Matta, A.,(1985). Retardation of *Fusarium* Wilt symptoms in tomato by pre and postinoculation treatments of the roots and aerial parts of the host in hot water . Physiological Plant Pathology,26, pp.175-183.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K.,(1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* The Pennsylvania State University Press, University Park,PA, USA, (1981), 391-399.
- Barna, B., Sarhan, A.R.T., Kiraly, Z.,(1983). The influence of nitro gennutrition on the sensitivity of tomato plants to culture filtrates of *Fusarium* and to fusaric acid. Physiological Plant Pathology, 23, pp.257-263.
- Bayaa, B., Erskine, W., (1998). Diseases of lentil. In :Allen, D.J., Lenné, J.J. The Pathology of Food and Pasture Legume CAB International , pp.423-471.
- Bélanger M., et Benoît D L., (2003). Inventaire 2003 des mauvaises herbes en sol organique. Cahier de conférences, Journées horticoles régionales « Terre noire », Saint-Rémi (Québec), décembre 2003.
- Benhamou N., Chet I., (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology 86, p. 405–416.
- Benhamou N., Chet I.,(1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Appl. Environ. Microbiol. 63, p. 2095–2099.
- Bissett J.,(1991). A revision of the genus *Trichoderma*. La section *Pachybasium*. (a) can.J.Bot., , 69: 2373-2417.
- Bissett J.,(2004). Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossaryorg/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html.
- Blancard, D. Laterrot, H. Marchoux,G .Candresse,T.,(2012). A colour Handbook-Tomato Diseases :identification ,biology and control.Manson Publishing Ltd.688 pp.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P.,Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P.,(1990). Moisissures utiles et nuisibles,importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- Caron J., (2002). Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémile 5 décembre 2002.

- Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P.,(2002).** Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.
- Champion, R., (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques etPratiques. INRA Editions p166 à 197.
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld et I. Chet., (1986).** Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum*. Plant Disease, 70: 145-148.
- **Chen, G.-H., J. L. Curtis, C. H. Mody, P. J. Christensen, L. R. Armstrong, and G. B.Toews.,(1994).** Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on rat alveolar macrophage anti cryptococcal activity in vitro. J. Immunol. 152:724–734.
- Chermette R., Bussieras J.,(1993).** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Cooney, J.M. ; Lauren, D.R. et Perry-meyer, L.J.,(1997).** A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface.Letters in Applied Microbiology., 24 (6) : 460-462.
- Cournut, B.,(1984).** Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th: Pharmacie: Marseille : 77 p.
- Criquets.,Calvertv.,(2008).** IMEPUMRCNRS 6116. Planche Tp mycologie publié surin ternetle03/03/2008.
- Daami- Remadi M. and 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. et Rouxel F., (1997).** Détection et isolation des champignons du sol. , (edn INRA Paris.
- Davet P.,(1996).** Vie microbienne du sol et production végétales, (edn) INRA. Paris.
- De Kouassi.,(2001).** Les possibilités de la lutte microbiologique : Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Vertigo 2 :2 (2001).
- Denis C. et Webster I.,(1971).** « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. Trans. Br. Mycol. Soc. 5741-48.
- 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, pp 35-49. INRA, Paris (FR).
- Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M.,(1989).** *Fusarium moniliforme* keratitis, Acta ophthalmol., Scand. 67, 710-713
- Esposito, E. et silva, M.,(1998).** Systematics and environmental application of genus *Trichoderma*.1998. Crit. Rev. Microbiol., 24(2) : 89-98.
- Ezzi, M.I. et J.M. Lynch.,(2002).** Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. Enzyme and Microbial Technology, 31: 1042-1047.
- Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y.,(2005).** Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied and Environmental Microbiology 71, 363–370.
- Fernandes, B., (2005).** Luttebiologique.PHM% Revue horticole,465,pp.31
- Gaigole A. H., Wagh G. N., Khadse A. C.,(2011).** Antifungal activity of *Trichoderma* species against soil borne pathogen. Asiatic Journal of Biotechnology Resources, 2: 461-465

- Gams, W. et Bissett, j.,(1998). Morphology and identification of *Trichoderma* sp. *Trichoderma & Gliocladium*, Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Londres. -Kubicek, C.P.; Harman, G.E. & Ondik, K.L., CRC Press.,(1998). pp.3-34, 300 P.
- Gari Toussaint M., Leguay J.M., Zur C., Michiels J.F., Ferraen L., Negre S., Le Fichoux Y.,(1997). Keratite à *Fusarium solani* chez une patiente diabétique, *J. Mycol. Med.*, 7, 227- 231
- Genilloud, O., Pelaez, F., genzalez, i.& Diez, m.t., (1994). Diversity on actinomycètes and seaweeds from the iberian coasts. *Microbiologia*, 1994, 10: 413-422
- Grondona, I. ; Hermosa, R. ; Tejada, M. ; Gomis, M.D. ; Mateos, P.S.; Bridge, P.D.; Monte, E. et Garcia-Acha, I., (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma Harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *App. Environ. Microb.*, 63 (8): 3189-3198
- Guarro J., Gene J., (1992). *Fusarium*infections, Criteria for the identification of the responsible species, *Mycoses*, 35, 109-114
- Guillemette T.,2003. Contribution à l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d'*Alternaria brassicae*, l'agent du black spot des crucifères. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers.
- Hamoir, J., Goret, M., Mignon, B., and Gustin, P.,(2001). Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses. *Ann. Med.Vet.*145:226-232
- Haran, S., H. Schickler et I. Chet., (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Harman G.E.,(2001). Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. Dans : Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century: Mode of Action and Application Technology. Tzeng, D.D.S. et J.W. Huang (éds). Taichung City, Taiwan, National Chung Hsing University, pp 71–84.
- Harman, G.E., (2000). Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet et M. Lorito.,(2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N.,(1995). *Dictionary of the fungi* , 8th ed. CAB. International Walling Ford. United Kingdom.
- Hawkes,JG.,(1994). *The potato:evolution, biodiversity and genetic resources.*, Londer,Belhaven Press.259 pp.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M.,(2004). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum f. sp. radicleslycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2005 9 (3), 163–171.
- Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A.,(1996). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26, p. 697–705
- Howell CR., (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, p. 4–10.
- Kubicek, C.P ; Bissett, J. ; Druzhinina, I., Kullinig-Gradinger, C. et Szakacs, G.,(2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.; a case study on south-east asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, , 38 (3): 310-319.
- Landreau, A.,(2001). Métabolites d'une souche de *Trichoderma Koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, Biologie et risques pour les coquillages en culture. Th. :Pharmacie : Nantes :, 201p.

- **Lawrie J., Down V. M. et Greaves M. P.,(2000).** Factors Influencing the Efficacy of the Potential Microbial Herbicide *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on *Amaranthus retroflexus*(L.). *Biocontrol Science and Technology* 10: 81-87.
- Leuchtman, A. ; petrini,O. et samuels, g.,(1996).** Isozymes subgroups in *Trichoderma* section Longibrachiatum. *Mycologia*, 1996, 88 (3) : 384-394.
- Lillard-Roberts, S. *Trichoderma harzianum*. Mold-help [en ligne]. 2004**[consulté le 21 octobre 2004]. Disponible sur : <http://mold-help.org/content/view/431/>
- Lindsey, D. et R. Baker.,(1967).** Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.
- Maslouhi A.,(1989).** Contribution à l'étude in vitro des antagonistes de *Fusarium oxysporum F.sp Albedinis*, agent causal du Bayoud, pp 4-8. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc) .
- **Meddah N, Aouazzani T.,(2006).** Bulletin de l'Institut Scientifique 2006, Caractérisation de la mycoflore pathogène d'*Hibiscus rosa-sinensis* L. et d'*Acalypha wilkesiana* J. Mueller de la ville de Kénitra (Maroc) n°28, 7-11.
- Mouria, B., A. Ouazzani Touhami, A. Badoc. et A. Douira.,(2005).** Effet de diverses farines sur la compétitivité des inoculums de trois souches de *Trichoderma* vis-à-vis des champignons phytopathogènes du sol. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux*, 144: 211-224.
- Mrabet, B.,(1998).** Incidence de la fusariose au nord de la Tunisie. Identification de source de résistance chez le blé. École Supérieure Agronomique de Kef, Kef, Tunisie, 60 p.
- Nehld. et Brown J.,(2000).** Biological control of the Noogoora burr complex with *Alternaria zinniae*: environmental conditions favouring disease. *Australasian Plant Pathology* 29: 71-80.
- Nelson, P.E., Toussoun T.A., Marass W.F.O.,(1983).** *Fusarium* Species: An illustrated manuel for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park , Pa , 193 pp.
- Peralta, IE .Knapp, S. Spooner, DM.,(2006).** Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. Report of the tomato genetic cooperative. 56:5-12.
- Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G.,(2009).** Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* 47(5), 927–931
- Prieto, A, leal, J.A, Poeda, A., jiménez-Barbero,J., Gomez-Miranda, B., Domenech, J, Ahrazem, O., & Berabé, M.,(1997).** Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and hypocrea species. *Carbohydrate Research* 1997, 304 (3-4) : 281-291
- Rifai M, A.,(1969).** A revision of the genus *Trichoderma*, *Mycol. Pap.*, 116: 1-56.
- **Roquebert M-F.,(1996).** Intéractions antagonistes des *Trichoderma sp.* Dans les systèmes telluriques : systématique biologie et écologie des organismes. *Compte-rendu des 4 emes rencontres en toxicologie*, paris, 13-15.
- Samson R.A. and Hoekstra E.S.,(1988).** Introduction to food –born fungi, 3 edn . Centra Albureau Voor .Schimmelcultures. Baane. The Netherlands.
- Samuels, G. J. ;Petrini, O. et Mangui, S.,(1994).** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* , 86: 421-435.
- Sandhu SS, Sharma AK, Beniwal V, Boel G, Batra P, Kumar A, Jaglan S, Sharma AK, Malhotra S.,(2012).** Myco-biocontrol of insect pests, factor involved, mechanism, and regulation. *Journal of Pathogen*. 2012,126819.

- Shabanay, M., Charudattan. R. et Elwakilm. A.,(1995)**. Evaluation of *Alternaria eichhorniae* as a Bioherbicide for Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Green house Trials.*Biological Control* **5**: 136-144.
- Shalini, S. et A.S. Kotasthane.(2007)**. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **6**: 2272- 2283.
- Singh, A., S. Srivastava et H.B. Singh.,(2007)**. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology*, **98**:470-473.
- Smith, I.M., J. Dunez, D.H. Phillips, R.A. Lelliott, S.A. Archer, eds.,(1988)**. European hbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 583.Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009, **68** (1): 37-45.
- St Leger RJ, Wang C.,(2010)**. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 901–907.
- Sugiyama, J.,(1987)**. Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo:Elsevier, pp. 29-56, 325 p.
- Sun,S.K.,Huang,J.w.,(1985)**. Formulated soil amendment for controlling *Fusarium* wilt and other soilborne diseases.*plant Disease*,**69**,pp.917-920.
- Thomas P.A., Geraldine P.,(1992)**. Fungal keratitis due *Fusarium*and other fungi, *J. Mycol. Med.*, **2**, 121-131.
- Thomma, B. P. H. J.,(2003)**. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. **4** : 225-236.
- Tivoli .B.,(1988)**. Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en france sur la pomme de terre et dans son environnement .*Agronomie*, **8** (3) :211-222.
- Verbist, j.-f.,(2000)**. Marine fungal substances in: studies in natural products chemistry. Londres : Elsevier Sciences B.V., **24**: 979-1092.
- Verma, M.,(2007)**. Développement d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base de *Trichoderma SPP* en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada,424 p.
- Vining, I.c .,(1990)**. fonctions of secondary metabolites, *Annu.Rev.Microbiol.*, **44**: 395-427.
- Widden, P. et Abitbol, J.J.,(1980)**. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, **72** : 775-784.
- Xu XM, Nicholson P, Ritieni A.,(2007)**. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 67-71.
- Yedida, I., A.K. Srivastva, Y. Kapulnik et I.Chet.,(2001)**. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant soil*, **235**: 235-242.

Annex

Milieux de cultures

Milieu PDA Potatoes Dextrose Agar :

- Pomme de terre 200g
- Eau distillée 500ml
- Saccharose 20g
- Agar 20g
- Eau distillée 1000ml
- Ph 6

Eau physiologique :

- Chlorure de sodium 9g
- Eau distillée q.s.p 100ml

Thème

Etude d'antagonisme in vitro de *Trichoderma sp.* vis-à-vis des ravageurs des plantes : *Fusarium oxysporum* et *Alternaria alternata* .

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des mycètes

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre le champignon phytopathogène "le *Fusarium oxysporium* et *Alternaria alternata*".

Les champignons du genre *Fusarium* et *Alternaria* , ont été isolés à partir de tomate et l'olivier infectées. l'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

La lutte biologique contre ces phytopathogènes, est mise en évidence en utilisant la souche du genre *Trichoderma* isolée à partie du sol agricole de la wilaya d'Ouargla au Sud Algérien.

les essais de confrontation directe et à distance, sur milieu de culture, entre les souches pathogènes et *Trichoderma sp* ont révélé que ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* et de *Alternaria alternata* de plus de 50 % par rapport au témoin et ce après quatre jours d'incubation à 28 °C en confrontation directe. De plus, au delà de cette période et au terme de six jours, le *Trichoderma sp.* envahit les colonies pathogènes sur lesquelles il sporule même, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. alors que les résultats de la confrontation à distance montrent des pourcentages d'inhibition considérables varient de 36% avec le *Fusarium oxysporum* à 62% avec *Alternaria alternata* et ce après six jours.

Mots clés : *Trichoderma sp.* ; *Fusarium oxysporum*; *Alternaria alternata* ; lutte biologique ; antagonisme.

Laboratoire de recherche :

laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) Chaab Erssas, Université des frères Mentouri, Constantine.

Jury d'évaluation

Présidente du jury	: Mm BATAICHE Insaf	Dr.Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Rapporteur	: Mr. DEHIMAT L.	Pr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Examineur	: Mr. KHOUDJA Youcef	Dr.Univ. Des Frères Mentouri Constantine
Tutrice	: Mme GHORRI Sana	Dr.Univ. Des Frères Mentouri Constantine

Date de soutenance : 30/06/2016