

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université frères Mentouri**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**



N° d'Ordre : 24/ D3C /2015  
N° de Série : 05 / MicB / 2015

**Thèse**

Présentée pour l'obtention du **Diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD**

**En Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques**

Par

**Mme. GHORRI Sana**

**Isolement des microorganismes possédant une activité  
anti- *Fusarium***

**Soutenue : Le 12 / 10 / 2015**

***Devant le Jury***

Président :	M <sup>r</sup> KACEM CHAOUCHE N.	Professeur, Univ frères Mentouri Constantine
Directeur de thèse :	M <sup>r</sup> DEHIMAT L.	Professeur, Univ frères Mentouri Constantine
Examineurs :	M <sup>me</sup> MIHOUBI I.	Professeur, Univ frères Mentouri Constantine
	M <sup>r</sup> SNOUCI M.	Professeur, Université d'Oum el Bouaghi
	M <sup>r</sup> GUECHI A.	Professeur, Université de Sétif
	M <sup>r</sup> YAHIA A.	Professeur, Centre Universitaire Mila
Invité:	M <sup>r</sup> OUFROUKH A.	Docteur et Directeur, INRA Constantine

**Année Universitaire 2015-2016**

## *Dédicaces*

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : **mes parents**.  
Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là  
c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

A mes sœurs, Zineb et Soumeya

A mes frères

A mon cher époux Mustapha

A mon beau frère chawki

A mes belles sœurs

A mes nièces et mes neveux

A toute ma famille et tous mes amis

GHORRI Sana

## ***Remerciements***

Je remercie Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné santé, courage, volonté et patience pour avoir réalisé ce travail.

Avec une rigueur et un intérêt constant à M<sup>f</sup> DEHIMAT LAID, Professeur à l'université frères Mentouri Constantine a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques. .

J'adresse mes remerciements et exprimer ma gratitude à Mr KACEM CHAOUCHE Noredine Professeur à l'université frères Mentouri Constantine qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce travail sans oublier ses encouragements et ses conseils durant tout mon parcours universitaire.

Je remercie également Madame MIHOUBI Ilhem , Professeur à l'université frères Mentouri Constantine pour avoir accepté de faire partie du jury et de juger mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur GUECHI A. Professeur à l'université de Sétif, Monsieur M<sup>f</sup> SNOUCI M. Professeur à l'université d'Oum el Bouaghi, M<sup>f</sup> YAHIA A. Professeur, Centre Universitaire Mila et M<sup>f</sup> OUFROUKH A. Docteur et directeur, INRA Constantine pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Des remerciements particuliers s'adressent à JAOUANI Atef, Maître de conférences à l'institut Supérieur des Sciences Biologiques (I.S.S.B.A.T) de Tunis et son équipe du laboratoire LMBA pour avoir accepté de m'accueillir aussi chaleureusement et de suivre de très près la partie de biologie moléculaire de ma thèse.

Je voudrais adresser de Sincères remerciements au Professeur BOUDABOUS Abdelatif responsable du laboratoire de LMBA Tunis.

Un **ENORME** merci à tous ceux qui m'ont aidé, m'ont conseillé, m'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que je n'ai à citer leurs noms à toute l'équipe du laboratoire **LaMyBAM** université frères mentouri Constantine: Dr. Benserradj ouafa, Dr. Youcef Ali mounia, Dr. Kara Ali mounira, Dr. Bataich insaf et Dr. Benchiheub meriem, à Asma, Sara, Imen, Ouided, Anissa, et bien sur ma chère Amina.

Des remerciements s'adressent également à toute l'équipe de laboratoire de microbiologie , **MAROUAN Fateh**, meriem, amira, nassima ....chacun d'entre vous a participé activement au bon déroulement de ce travail de thèse et sans vous, certaines études expérimentales n'auraient pu être réalisables.

## Table des matières

1.Introduction.....	1
2. Revue bibliographique .....	4
2.1- Généralités sur les champignons. ....	4
2.2. Les champignons filamenteux .....	5
2.2.1- Caractéristiques morphologiques. ....	5
2.2.2. Développement.....	6
2.3- Le genre <i>Fusarium</i> .....	7
2.3.1. Aspects Morphologiques.....	7
2.3.2. Taxonomie.....	9
2.3.3. Identification.....	10
2.3.4. Potentiel toxigène.....	11
2.3.5. Pouvoir pathogène.....	12
2.4. La fusariose.....	13
2.4.1 Dégâts de la fusariose.....	14
2.4.1.1. Fonte de semis (Seedling blight).....	14
2.4.1.2. Pourriture des racines (Root rot ou common root rot).....	14
2.4.1.3. Pourriture du pied (Foot rot ou dry land foot rot).....	15
2.4.2. Cycle biologique de la maladie.....	15
2.4.3.Moyens de lutte contre La Fusariose.....	16
2.4.3.1. Pratiques culturales.....	16
2.4.4. Moyens de lutte biologique.....	17
2.5. Le genre <i>Trichoderma</i> .....	17
2.5.1. Morphologie.....	17
2.5.2. Taxonomie.....	18
2.5.3. Ecologie.....	21
2.5.4. Pouvoir antagoniste de <i>Trichoderma</i> .....	21

2.5.5. Mode d'action de <i>Trichoderma</i> .....	23
2.5.6. Production de métabolites intéressants.....	24
3. Matériel et méthodes.....	28
3.1- Isolement et identification de l'agent pathogène.....	28
3.1.1- Isolement de l'agent pathogène.....	28
3.1.2- Purification et conservation des isolats fongiques.....	29
3.1.3- Identification des isolats fongiques.....	29
3.1.3.1- Etude morphologique.....	29
3.1.3.2- Etude par voie moléculaire.....	29
3.2- Isolement et identification de l'agent antagoniste.....	33
3.2.1- Site de prélèvement.....	33
3.2.2- Echantillonnage .....	33
3.2.3- Isolement des champignons antagonistes.....	33
3.2.4- Purification et conservation des isolats.....	33
3.2.5- Sélection des isolats antagonistes vis-à-vis du <i>Fusarium</i> .....	34
3.2.5.1- Antagonisme par confrontation directe.....	34
3.2.5.2- Antagonisme par confrontation à distance.....	35
3.2.6- Identification des isolats sélectionnés .....	36
3.2.6.1- Critères d'identification macroscopique.....	36
3.2.6.2- Critères d'identification microscopique.....	37
3.2.6.3- Identification par voie moléculaire.....	37
3.2.7. Effet du pH sur le développement des souches antagonistes.....	37
3.3- Test de l'activité enzymatique des souches antagonistes.....	40
3.3.1- Activité chitinase.....	40
3.3.2- Activité protéase .....	40
3.3.3- Activité cellulase .....	40
3.3.4- Activité lipase.....	40

3.4- Production et extraction des molécules bioactives élaborées par les antagonistes sélectionnés.....	41
3.4.1- Production de métabolites secondaires par fermentation.....	41
3.4.2- Mise en évidence de l'activité antifongique des surnageants de culture.....	41
3.4.3- Extraction des molécules bioactives.....	42
4. Résultats.....	44
4.1. Isolement et identification de l'agent pathogène.....	44
4.1.1. Isolement de l'agent pathogène.....	44
4.1.2. Identification des isolats.....	44
4.1.2.1. Identification morphologique.....	44
4.1.2.2. Etude moléculaire.....	48
4.2. Isolement et identification de l'agent antagoniste.....	49
4.2.1. Isolement des microorganismes antagonistes.....	49
4.2.2. Sélection des isolats antagonistes de <i>Fusarium</i> .....	50
4.2.3 La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches sélectionnées.....	50
4.2.3.1- Antagonisme par confrontation directe.....	51
4.2.3.2- Antagonisme par confrontation à distance.....	52
4.2.3.3- Identification des isolats sélectionnés.....	53
4.3- Effet du pH sur le développement des souches antagonistes.....	60
4.3.1- Effet du pH sur milieu liquide (Technique du microplaque- BIOLOG).....	60
4.3.2- Effet du pH sur boîte.....	63
4.4. Test de l'activité enzymatique des souches antagonistes.....	65
4.4.1- Activité chitinase.....	65
4.4.2- Activité protéase.....	65
4.4.3- Activité cellulase.....	66
4.4.4- Activité lipase.....	67
4.5. Production et extraction des molécules bioactives élaborées par les antagonistes sélectionnés.....	68

4.5.1- Production de métabolites secondaires par fermentation.....	68
4.5.2- Mise en évidence de l'activité antifongique des surnageants de culture.....	68
4.5.3- Extraction des molécules bioactives.....	72
4.5.3.1- Test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques des souches antagonistes.....	73
5- Discussion.....	76
6- Conclusion et perspectives.....	88
7- Résumé.....	90
8- Abstract.....	91
8'- ملخص.....	92
9- Références bibliographiques.....	93
10- Annexes	

## Listes des figures

<b>Figure 1</b> Les grands groupes des eumycètes (Durrieu, 2008).....	4
<b>Figure 2</b> Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).....	5
<b>Figure 3</b> Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe et Stevens, 2008).....	6
<b>Figure 4</b> Différents modes de sporulation et les différents types de spores associées (Barnett et Hunter 1998).....	7
<b>Figure 5</b> Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.....	7
<b>Figure 6</b> Terminologie pour décrire la morphologie du genre <i>Fusarium</i> (de Hoog <i>et al.</i> , 2011).....	9
<b>Figure 7</b> Représentation d'une unité d'ADN ribosomique. ETS: externally transcribed spacer, ITS: internally transcribed spacer et IGS: intergenic spacer.....	11
<b>Figure 8</b> Cycle de <i>Fusarium spp.</i> : Illustration des différents modes d'action (Caron, 2000)..	16
<b>Figure 9</b> Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Samuels <i>et al.</i> , 1994).....	18
<b>Figure 10</b> Confrontation directe entre <i>Fusarium</i> et les antagonistes.....	34
<b>Figure 11</b> Confrontation à distance entre <i>Fusarium</i> et les antagonistes.....	35
<b>Figure 12</b> Plaques de micro titrage à 96 puits.....	37
<b>Figure 13</b> System BIOLOG.....	38
<b>Figure 14</b> Résultats de BIOLOG.....	39
<b>Figure 15</b> Séparation sur gel d'agarose (1.5%) des produits d'amplification par PCR des ADN des isolats de <i>Fusarium</i> .....	48
<b>Figure 16</b> Inhibition du développement de <i>Fusarium</i> par trois différents isolats antagonistes. ....	51
<b>Figure 17</b> Estimation des pourcentages d'inhibition des souches pathogènes par les souches antagonistes isolées.....	52
<b>Figure 18</b> Observation microscopique de la zone de contact entre le pathogène et l'antagoniste.....	52

<b>Figure 19</b> : Estimation des pourcentages d'inhibition des souches pathogènes par les souches antagonistes.....	53
<b>Figure 20</b> Séparation sur gel d'agarose (1.5%) des produits d'amplification par PCR de l'ADN des isolats de <i>Trichoderma</i> .....	59
<b>Figure 21</b> Effet du pH sur les différentes souches de <i>Trichoderma</i> . les souches TC, TB, TH .....	61
<b>Figure 22</b> Effet du pH sur les différentes souches de <i>Trichoderma</i> . les souches T1, T1", T1"x et T2,.....	62
<b>Figure 23</b> Effet du pH sur le développement des différentes espèces de <i>Trichoderma</i> .....	64
<b>Figure 24</b> Test de l'activité chitinase des souches de <i>Trichoderma</i> .....	65
<b>Figure 25</b> Test de l'activité protéase des souches de <i>Trichoderma</i> .....	66
<b>Figure 26</b> Test de l'activité cellulase des souches de <i>Trichoderma</i> .....	67
<b>Figure 27</b> Test de l'activité lipase des souches de <i>Trichoderma</i> .....	67
<b>Figure 28</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium verticilloides</i> (X) cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma album</i> (TC) et <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T2)...	68
<b>Figure 29</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium verticilloides</i> (X') cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma album</i> (TC) et <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T2)...	68
<b>Figure 30</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium oxysporum</i> (Gh) cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma album</i> (TC) et <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T1 et T1"x) et <i>Trichoderma viride</i> (T1").....	68
<b>Figure 31</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium solani</i> (FGh) cultivé cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma album</i> (TC) et <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T1) et <i>Trichoderma viride</i> (T1").....	68
<b>Figure 32</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium solani</i> (FO) cultivé en en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma album</i> (TC) et <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T1 et T1"x).....	69
<b>Figure 33</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium oxysporum</i> (FGB) cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma album</i> (TC), <i>Trichoderma harzianum</i> (TB) <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T1 et T1"x) et <i>Trichoderma viride</i> (T1").....	69
<b>Figure 34</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium oxysporum</i> (Rpal) cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T1 et T2).....	69

<b>Figure 35</b> Cinétique de développement de <i>Fusarium solani</i> (Fp2) cultivé en présence des surnageants de culture de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T1 et T2) et <i>Trichoderma viride</i> (T1").....	69
<b>Figure 36</b> Test de l'activité laccase des souches de <i>Trichoderma</i> .....	72
<b>Figure 37</b> Etapes de l'extraction des métabolites des souches de <i>Trichoderma</i> .....	72
<b>Figure 38</b> Effet de l'extrait chloroformique de <i>Trichoderma album</i> (TC) sur les espèces de <i>Fusarium</i> testées.....	73
<b>Figure 39</b> Effet de l'extrait chloroformique de <i>Trichoderma</i> sur les souches pathogènes (technique des disques imbibés).....	75

### Annexe 3

<b>Figure 40</b> cinétique de développement de la souche pathogène X sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe	
<b>Figure 41</b> cinétique de développement de la souche pathogène X sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte	
<b>Figure 42</b> cinétique de développement de la souche pathogène X' sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe	
<b>Figure 43</b> cinétique de développement de la souche pathogène X' sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte	
<b>Figure 44</b> cinétique de développement de la souche pathogène FO sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe	
<b>Figure 45</b> cinétique de développement de la souche pathogène FO sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte	
<b>Figure 46</b> cinétique de développement de la souche pathogène GH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe	
<b>Figure 47</b> cinétique de développement de la souche pathogène GH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte	
<b>Figure 48</b> cinétique de développement de la souche pathogène FGH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe	
<b>Figure 49</b> cinétique de développement de la souche pathogène FGH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte	
<b>Figure 50</b> cinétique de développement de la souche pathogène FP2 sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe	

**Figure 51** cinétique de développement de la souche pathogène FP2 sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte

**Figure 52** cinétique de développement de la souche pathogène Rpal sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe

**Figure 53** cinétique de développement de la souche pathogène Rpal sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte

**Figure 54** cinétique de développement de la souche pathogène FGB sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe

**Figure 55** cinétique de développement de la souche pathogène FGB sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte

**Figure 56** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma harzianum* (TB) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

**Figure 57** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma virens* (Th) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

**Figure 58** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma longibrachiatum* (T1) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

**Figure 59** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma viride* (T1") sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

**Figure 60** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma longibrachiatum* (T1"x) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

**Figure 61** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma longibrachiatum* (T2) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

## Listes des tableaux

<b>Tableau 1</b> Les <i>Fusarium</i> producteurs des mycotoxines (Pitt, 2000).....	12
<b>Tableau 2</b> Sites et période d'échantillonnage.....	28
<b>Tableau 3</b> Observations macroscopiques des différents isolats pathogènes obtenus.....	45
<b>Tableau 4</b> Description de l'aspect microscopique des isolats pathogènes sélectionnés.....	46
<b>Tableau 5</b> Affiliation phylogénétique des isolats pathogènes.....	49
<b>Tableau 6</b> Observation macroscopique des souches antagonistes.....	54
<b>Tableau 7</b> Observation macroscopique des souches antagonistes sur différent milieux de cultures.....	56
<b>Tableau 8</b> Interprétation des observations microscopiques des isolats antagonistes.....	57
<b>Tableau 9</b> Affiliation phylogénique des isolats antagonistes.....	60
<b>Tableau 10</b> Aspects macroscopiques des souches pathogènes cultivées en présence des surnageants de culture des antagonistes.....	70

## Publication et Communications

Les travaux réalisés ont été valorisés par la publication d'un article dans une revue internationale impactée, et des communications dans différents congrès.

### Publication:

1) **S.Ghorri , L.Dehimat O.Benserradj and N.Kacem Chaouche.**2014 . Assays *In Vitro* of the biological control by using three species of *Trichoderma* against various species of *Fusarium* Agent of Fusarium. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2014) 3(1): 54-62.

### Communications:

- 1) **GHORRI S, BENSERRADJ O., LAOUAR M., DEHIMAT L** .Le pouvoir antagoniste d'une souche du genre *Trichoderma* isolée du Nord Algérien contre des pathogènes du genre *Fusarium* 1<sup>ier</sup> congrès de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Resources (BVBR) Tunisie, (Mars 2013).
- 2) **GHORRI S., BENSERRADJ O, LAOUAR M , DEHIMAT L.** essai de lutte biologique contre la fusariose des plantes cultivées par l'utilisation des microorganismes antagonistes. séminaire international de protection phytosanitaire. Batna, Algérie ( Novembre 2013).
- 3) **GHORRI S., BENSERRADJ O., Lahmar A., Hadjris B., DEHIMAT L.,** La lutte biologique contre la Fusariose de pois chiche dans la wilaya de Constantine. IV<sup>ème</sup> Journées scientifiques de la Faculté des sciences de la nature et de la vie (université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie le 9 et 10 Avril).
- 4) **GHORRI SANA , BENSERRADJ OUAFA , KROUMA HAMIDA , LAOUAR MERIEM , DEHIMAT LAID** .Essai De Lutte Biologique *In Vitro* Par Utilisation De Trois Espèces De *Trichoderma* À L'égard De Différentes Espèces De *Fusarium* Agent De La Fusariose, 4<sup>ème</sup> journées scientifiques internationales sur la valorisation des bio ressources (ATVAB). Sousse –Tunisie ( Mai 2013).

## 1. Introduction

L'agriculture constitue la base de l'économie. Malheureusement celle-ci est soumise à plusieurs contraintes, essentiellement d'ordres abiotique et biotique. Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures. De nombreuses cultures vivrières et de rente sont ravagées par des parasites, dont les plus notoires sont les champignons phytopathogènes. Parmi ceux-ci, les espèces du genre *Fusarium*.

Sur le plan économique, le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe de nombreuses espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) 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 (Anonyme, 2004 ; Lauzon *et al.*, 2007) et la tomate, (Hibar *et al.*, 2007). La fusariose est une maladie responsable du flétrissement ou de la pourriture des racines et des collets des plantes. Dans certains cas, surtout chez les plantes céréalières, les graines peuvent être impropres à la transformation et à la consommation à cause de la contamination par *Fusarium*.

Il existe de nombreuses espèces de *Fusarium*, dont certaines seulement sont pathogènes et/ou sont susceptibles d'émettre des mycotoxines (fusariotoxines en l'occurrence), posant problèmes en [agriculture](#) ou en [médecine](#) humaine et pour l'[industrie agroalimentaire](#).

De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), les légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

Les produits chimiques utilisés à l'heure actuelle pour lutter contre les agents responsables de la fusariose présentent des inconvénients. La plupart d'entre eux, sont toxiques pour les utilisateurs qui entrent en contact avec la substance de préservation. Cela justifie les recherches actuellement menées dans ce domaine, qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement (Lounaci et Athmani, 2014).

De ce fait, la lutte biologique contre ces moisissures phytopathogènes, s'avère très importante, et ce par l'utilisation de microorganismes producteurs de substances à effet antifongique.

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 microbiologique 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.

Des études ont permis d'identifier certains microorganismes impliqués dans les mécanismes de résistance des sols afin de pouvoir sélectionner les plus efficaces et de les utiliser comme agents de lutte biologique (Rouxel *et al.*, 1979). En fait, la présence d'un agent de lutte biologique dans le sol: (i) Favorise le développement de la plante; (ii) Assure une protection accrue du système racinaire; (iii) Préviend des pertes de rendement pour le producteur; (iv) Diminue l'utilisation de pesticides chimiques de synthèse utilisés pour combattre les agents pathogènes; (v) Réduit la pollution de l'environnement.

Dans cette optique, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se focalise sur " l'isolement des microorganismes possédants une activité anti-*Fusarium*". Cette étude, repose sur plusieurs points importants : (i) L'isolement de l'agent pathogène (le *Fusarium*), à partir de différent espèces végétales infectées; (ii) L'isolement , à partir du sol, des microorganismes qui ont des propriétés antagonistes contre le *Fusarium*; (iii) La production et la vérification des propriétés antagonistes, des métabolites actif des souches antagonistes.

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 "le *Fusarium*" et finalement à l'agent antagoniste étudié dans ce travail. 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.

- ✓ L'isolement de l'agent pathogène (le *Fusarium*), à partir de différent espèces végétales infectées;
- ✓ L'identification morphologique, macroscopique et microscopique, et par voie moléculaire des isolats pathogènes.

- ✓ L'isolement des microorganismes qui ont des propriétés antagonistes contre le *Fusarium*;
- ✓ L'identification morphologique, macroscopique et microscopique, et par voie moléculaire des isolats antagonistes;
- ✓ La production, par fermentation et extraction, des métabolites bioactif des souches antagonistes;
- ✓ La vérification des propriétés antagonistes des molécules bioactifs.

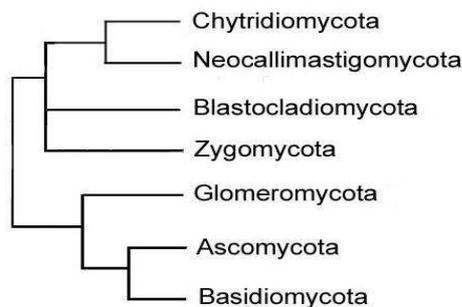
Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et la mise en évidence des perspectives de recherche.

## 2- Revue bibliographique

### 2.1- Généralités sur les champignons

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce sont des organismes eucaryotes à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Les spores produites peuvent avoir un rôle dans la dispersion des champignons, mais peuvent également jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Madelin, 1994). Leur mode de nutrition se fait par absorption en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur. Ces organismes sont dépourvus de chlorophylle et sont tous hétérotrophes (Carlile et Watkinson, 1994 ; Redecker, 2002).

Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des eumycètes (figure 1) ou cinquième règne (Kendrick, 2000). Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (Simpson et Roger, 2004; Adl *et al.* 2005). La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes ou *Fungi imperfecti*.

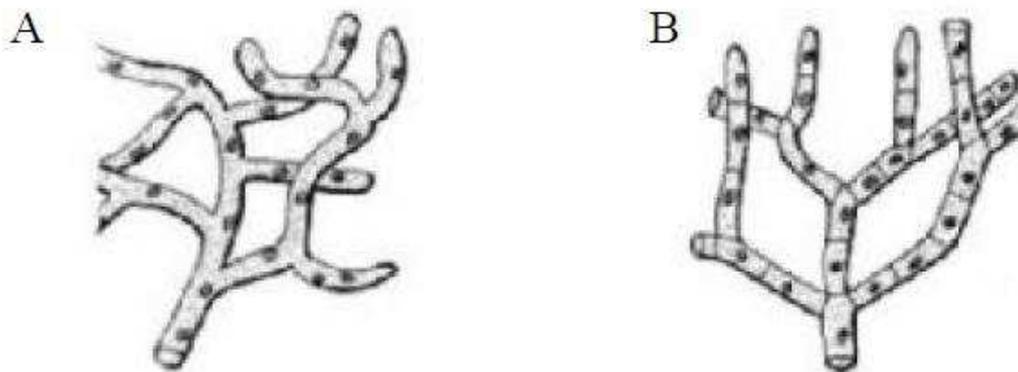


**Figure 1** Les grands groupes des eumycètes (Durrieu, 2008)

## 2.2- Les champignons filamenteux

### 2.2.1- Caractéristiques morphologiques

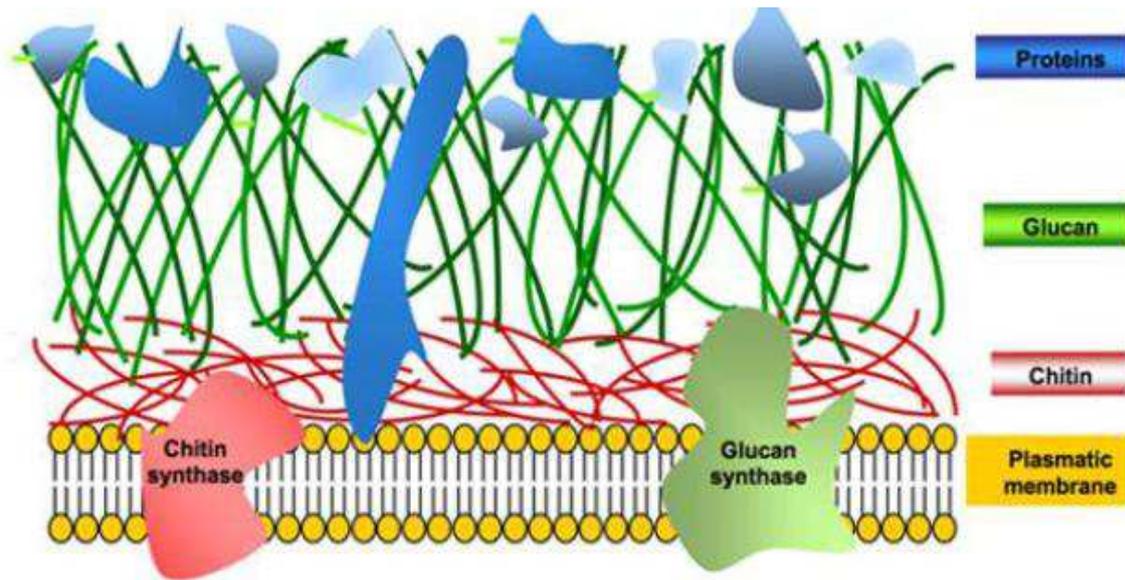
Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium (Gonçalves *et al.*, 2005). Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15  $\mu\text{m}$  et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Figure 2) (Girbardt, 1957; Trinci, 1969; Gregory, 1984 ; Bartnicki-Garcia, 2002). Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules (Justa-Schuch *et al.*, 2010 ). Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. (Chabasse *et al.*, 2002).



**Figure 2** Structure d'une hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonnée (Chabasse *et al.*, 2002).

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Figure 3). Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type  $\beta$ -1,4, et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ . Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi

cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi (Nwe et Stevens, 2008).

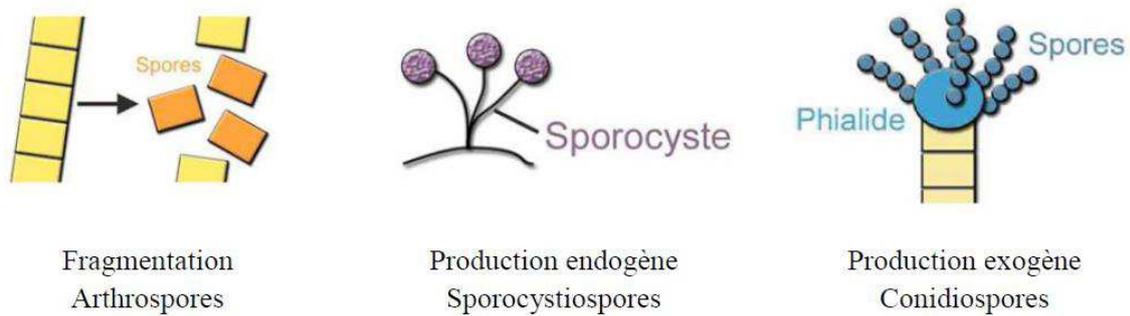


**Figure 3** Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe et Stevens, 2008).

### 2.2.2- Développement

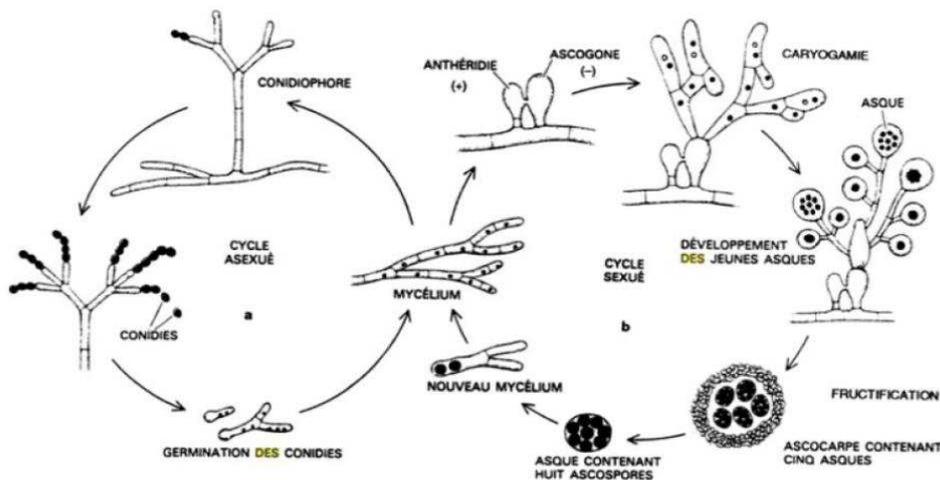
Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative et une phase reproductive. Pendant la phase végétative, qui correspond à la phase de croissance, l'appareil végétatif colonise le substrat par extension et ramification des hyphes (Davidson *et al.*, 1996). Cette phase correspond également à la phase de nutrition, les hyphes absorbant à travers leur paroi, l'eau ainsi que les éléments nutritifs contenus au sein du substrat tout en dégradant le substrat par émission d'enzymes et d'acides. La forme mycelienne en expansion, qui constitue une phase active de développement, est responsable de la dégradation et de l'altération du substrat (Zyska, 1997). La phase reproductive comprend deux types de reproduction : la reproduction asexuée, correspondant à la forme anamorphe, et la reproduction sexuée, correspondant à la forme téléomorphe. La reproduction asexuée correspond majoritairement à la dispersion de spores asexuées, permettant la propagation des moisissures afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction asexuée est appelée la sporulation (Adams *et al.*, 1998). Il existe différentes formes de reproduction asexuée et différents types de spores (Figure 4). Les spores peuvent être le résultat de la fragmentation. Dans ce cas, un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent de mycélium (arthrospores). Les spores peuvent aussi être produites de manière endogène à l'intérieur du sporocyste (sporocystiospores), ou de manière exogène en continu à l'extrémité des structures

spécialisées appelées phialides (conidiospores). Ensuite, les spores se détachent du mycélium sous l'effet d'un petit choc mécanique, d'un frôlement ou d'un courant d'air (Barnett et Hunter, 1998).



**Figure 4** Différents modes de sporulation et les différents types de spores associées (Barnett et Hunter 1998).

La reproduction sexuée se déroule en trois étapes : plasmogamie, caryogamie et méiose (Jennings et Lysek, 1996) (figure 5). La plasmogamie correspond à la fusion cellulaire entre deux cellules haploïdes. La cellule résultante est appelée dicaryon car elle possède deux types de noyaux haploïdes. Les deux noyaux vont fusionner lors de la caryogamie puis la méiose va convertir une cellule diploïde en quatre cellules haploïdes (Carlile et Watkinson, 1994). On recense également des modes de reproduction différents de celui qui précède : certains organismes garderont un mode de vie haploïde, d'autres un mode de vie uniquement diploïde, tandis que certains organismes (Deutéromycètes) n'ont pas de capacité de reproduction sexuée (Carlile et Watkinson, 1994).

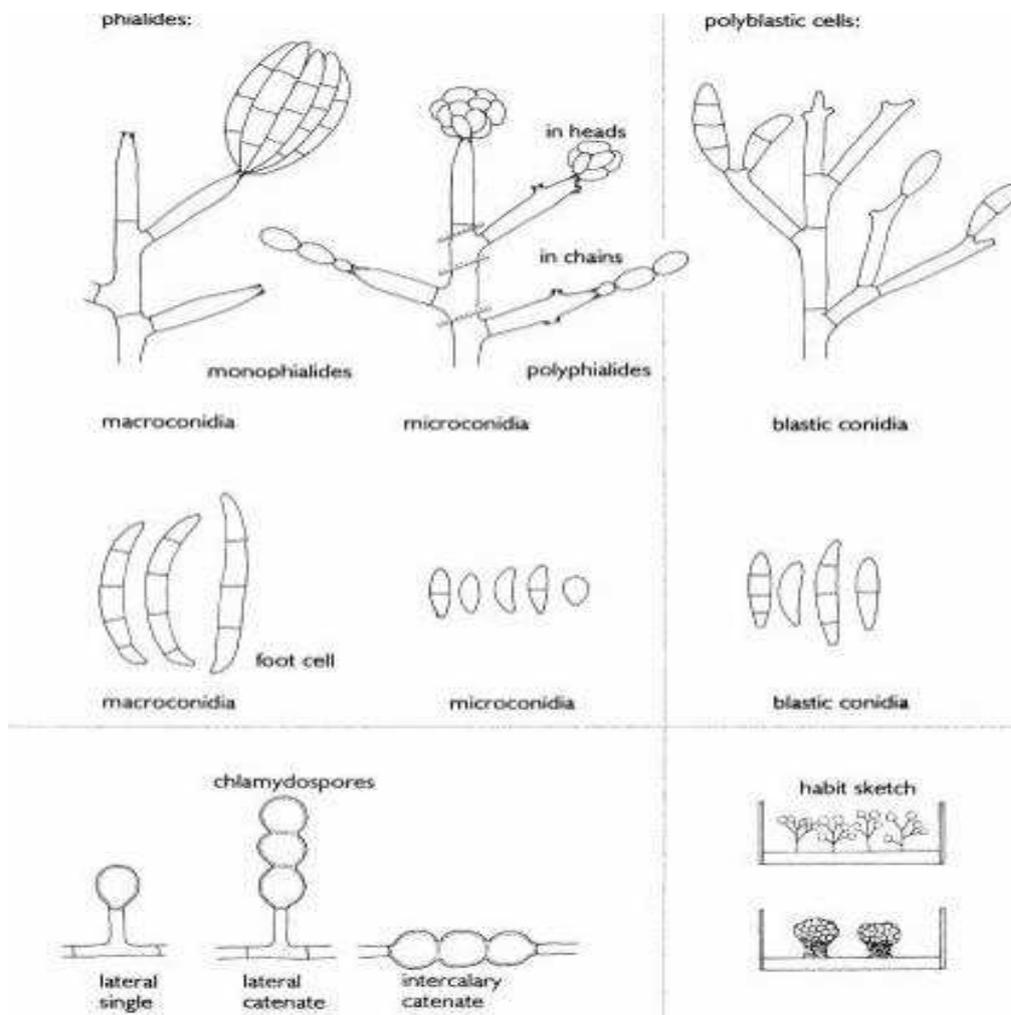


**Figure 5** Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.

## 2.3- Le genre *Fusarium*

### 2.3.1- Aspects Morphologiques

Les champignons du genre *Fusarium* appartiennent aux hyalo-hyphomycètes et présentent un mycélium septé et incolore. En culture, les colonies présentent souvent des nuances roses, jaunes, rouges ou violettes (Booth, 1985; Alves-Santos *et al.*, 1999; Katan et Ortoneda *et al.*, 2003). Les cellules conidiogènes se forment sur des hyphes aériens ou sur des conidiophores courts et densément branchés. Les conidies sont de trois types : macroconidies, microconidies et blastoconidies (figure 6). Les macroconidies falciformes, avec plusieurs septa transverses, une extrémité apicale crochue et une base pédicellée sont produites en basipétale (croissance à partir de la base) par les monophialides ou les sporodochia (agrégats de conidiophores) et sont accumulées en masse. Les microconidies sont ellipsoïdes, ovoïdes, subsphériques, pyriformes, claviformes ou allantoïdiennes, généralement unicellulaires et présentent une base arrondie ou tronquée. Elles sont produites en séries basipétales sur des mono ou polyphialides et accumulées en petites têtes ou en chaînes. Les blastoconidies sont produites séparément sur des cellules polyblastiques et présentent de 0 à 3 septa. Des chlamydospores, souvent présentes, sont hyalines ou pâles, intercalaires ou terminales et possèdent une paroi épaisse (de Hoog *et al.*, 2011).



**Figure 6** Terminologie pour décrire la morphologie du genre *Fusarium* (de Hoog et al., 2011)

### 2.3.2 - Taxonomie

La taxinomie ou taxonomie a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier, les nommer et enfin les classer. Depuis la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, une nouvelle approche conceptuelle de ces classifications est possible grâce à la biologie moléculaire. La taxinomie en mycologie est donc en constante évolution suite aux données recueillies lors des différentes approches phylogénétiques. Ce remodelage des classifications s'applique également pour le genre *Fusarium*. Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Ascomycota, à la classe des *Sordariomycetes* et à l'ordre des Hypocreales (Catalogue of life, 2014). Il s'agit d'un genre polyphylétique à la taxinomie complexe. Par exemple, *Fusarium solani* et *Fusarium verticillioides* possèdent des formes

sexuées (téléomorphes) appartenant respectivement aux genres *Nectria* ou *Gibberella* alors que *Fusarium oxysporum* n'est actuellement connu que sous sa forme asexuée (anamorphe). La taxinomie du genre autrefois basée sur les aspects morphologiques ou l'adaptation à un substrat particulier, a été revue en profondeur avec l'avènement des techniques de phylogénie moléculaire . Les données récentes issues de ces travaux montrent que les anciennes taxinomies sont en partie erronées. Ceci s'est traduit par le rattachement d'espèces des genres *Acremonium* ou *Cylindrocarpon* au sein du genre *Fusarium* telles que *Acremonium falciforme* ou *Cylindrocarpon lichenicola* (Summerbell *et al.*, 2002) mais aussi par la notion de complexes d'espèces non différenciables morphologiquement (espèces cryptiques).

### 2.3.3- Identification

L'identification des microchampignons est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères (Guarro *et al.*, 1999). Dans le cas des *Fusarium*, l'examen des macroconidies permet d'identifier rapidement le genre et en fonction de la forme et de la septation, donner une indication quant à l'espèce.

Des méthodes d'analyse biochimiques peuvent également apporter des informations sur le champignon. La détermination du contenu en acide gras, de la composition de la paroi cellulaire, de la composition en protéines ou encore des métabolites secondaires font partie des critères étudiés (Alves-Santos *et al.*, 1999; Baayen, 2000; Haan *et al.*, 2000). Les méthodes d'identification basées sur des techniques de biologie moléculaire ont fait leurs preuves et se sont imposées par leur fiabilité. Ces techniques sont majoritairement basées sur l'ADN. L'amplification par PCR de régions spécifiques est une méthode puissante pour l'analyse ciblée d'un type de champignon (Hsu *et al.*, 2003). Le polymorphisme d'amplification d'ADN aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD, Hadrys *et al.*, 1992) est une méthode consistant à amplifier à l'aide d'amorces dégénérées des cibles aléatoires. Le profil de bandes obtenu peut être caractéristique et permettre la distinction d'espèce de champignons (Carnegie *et al.*, 2001) mais aussi de races du même champignon (Mar Jimenez-Gasco *et al.*, 2003). Les méthodes basées sur l'analyse du polymorphisme de taille de fragments de restriction (Restriction Length Fragment Polymorphism : RFLP (Botstein *et al.*, 1980) et la combinaison PCR et RFLP : analyse du polymorphisme de fragments amplifiés (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences : CAPS) sont également des méthodes robustes (Kamiya *et al.*, 2004).

Ces méthodes de biologie moléculaire reposent sur des séquences cibles spécifiques utilisées pour les identifications, on retrouve l'ADN ribosomique (ADNr), l'ADN mitochondrial et parfois des séquences répétées de type microsatellites. Actuellement près de 700 000 séquences d'ADNr fongiques sont disponibles dans Genbank. Pour l'identification des champignons filamenteux, la cible prépondérante est l'ADNr (Guarro *et al.*, 1999). L'avantage de cette cible est multiple, il s'agit de séquences répétées dans le génome et retrouvées dans tous les organismes vivants.

L'unité minimale se compose de plusieurs parties, des séquences très conservées (18S, 5.8S et 28S) alternant avec des séquences beaucoup plus variables (ETS, ITS1 et 2 et IGS) (figure 7).



**Figure 7** Représentation d'une unité d'ADN ribosomique. ETS: externally transcribed spacer, ITS: internally transcribed spacer et IGS: intergenic spacer.

#### 2.3.4- Potentiel toxigène

Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines,.. ect (Pitt, 2000) (Tableau 2). Les mycotoxines synthétisées par les espèces du genre *Fusarium* leur confèrent un pouvoir pathogène important vis-à-vis des végétaux ou des mammifères dont l'Homme (Nucci *et al.*, 2007). Les mycotoxicoses sont ainsi dues à l'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines. La plus connue est l'aleukie alimentaire toxique secondaire à la consommation de céréales colonisées par *Fusarium sporotrichioides* et *Fusarium poae*. Les manifestations initiales sont gastro-intestinales mais secondairement apparaissent des symptômes cutanés et hématologiques avec immunosuppression. Les autres mycotoxicoses se manifestent sous forme d'ostéo-arthrose dystrophique chronique ou de symptômes gastro-intestinaux et neurologiques (Gupta, 2000). Ces champignons présentent également la capacité de produire du biofilm en présence de matériaux étrangers tels que les lentilles oculaires ou les cathéters. Le micro-organisme, ainsi intégré dans une matrice extracellulaire endogène, devient plus résistant aux différents traitements antifongiques ou aux solutions de nettoyage du matériel (Dyavaiah *et al.*, 2007; Ahearn *et al.*, 2008 ; Imamura *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2012). Peu d'études de virulence ont été réalisées sur le genre *Fusarium*. Cependant, parmi les espèces les plus courantes, celles du complexe d'espèces *Fusarium solani* semblent être les

plus virulentes. En effet, dans un modèle murin de fusariose chez l'animal immunocompétent, la médiane de survie était à 14 jours pour *Fusarium solani* alors que pour les autres espèces (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticilloïdes* et *Fusarium proliferatum*), une grande majorité d'animaux était encore en vie à la fin de la période d'observation de 30 jours (Mayayo *et al.*, 1999)

**Tableau 1** Les *Fusarium* producteurs des mycotoxines (Pitt, 2000)

Espèces de <i>Fusarium</i>	Mycotoxines produites
<i>Fusarium acuminatum</i>	moniliformine, trichotécènes type A
<i>Fusarium anthophilum</i>	moniliformine
<i>Fusarium avenaceum</i>	fusarine C, moniliformine
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	moniliformine
<i>Fusarium cerealis</i> ( <i>sin. crookwellense</i> )	culmorine, fusarine C, trichotécènes type B
<i>Fusarium culmorum</i>	culmorine, fusarine C, trichotécènes type B, zéaralénone
<i>Fusarium graminearum</i>	trichotécènes type B, zéaralénone
<i>Fusarium oxysporum</i>	acide fusarique, moniliformine, oxysporine
<i>Fusarium pallidoroseum</i> ( <i>sin. semitectum</i> )	moniliformine, zéaralénone
<i>Fusarium poae</i> ( <i>sin. tricinctum</i> )	fusarine C, trichotécènes type A
<i>Fusarium proliferatum</i>	moniliformine
<i>Fusarium sacchari</i>	moniliformine
<i>Fusarium sambucinum</i>	fusarine C, trichotécènes type A
<i>Fusarium solani</i>	acide fusarique, naftoquinone
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	fusarine C, trichotécènes type A, zéaralénone
<i>Fusarium verticillioïdes</i> ( <i>sin. moniliforme</i> )	fumonisines, fusarine C, gibberelines, moniliformine, naftoquinone

### 2.3.5- Pouvoir pathogène

Les *Fusarium* sont, principalement, des phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Les *Fusarium* sont généralement impliqués 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)

- *Fusarium verticillioides* est un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran *et al.*, 1989) ;

- *Fusarium oxysporum* est un agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hémodopathie maligne (Thomas et Geraldine, 1992) ;

- *Fusarium solani* est l'espèce la plus commune, impliquée dans les fusarioses rencontrées aux patients diabétiques. Il peut également être responsable des ulcères cornéens (del Palacio *et al.*, 1985 ; Gari-Toussaint *et al.*, 1997).

## 2.4- La fusariose

La fusariose est une maladie causée par des champignons du genre *Fusarium* qui vivent dans le sol, et attaquent de nombreuses plantes (Amzelloug, 1999). Il existe plusieurs espèces recensées de ce champignon dont à savoir *Fusarium oxysporum*. Ce dernier est un agent vasculaire qui se conserve dans le sol sous forme de chlamydospores et infecte les plantes via les racines qu'elles pénètrent directement ou par des blessures d'origine mécanique ou biologique (percées des racines secondaires, piqûres de nématodes,...). Les maladies dues à l'espèce *F. oxysporum* sont largement répandues dans le monde. Elles sont dommageables pour de nombreuses plantes maraîchères (tomate, cucurbitacées,...) et ornementales (œillet), ainsi que pour des cultures en plein champ telles que le coton, le bananier (la maladie de Panama) et le palmier dattier (maladie du Bayoud) causée par *Fusarium oxysporum albedinis* (*Foa*). Ce champignon qui se trouve dans le sol, pénètre par les racines en cheminant la sève et envahissant le bourgeon terminal du palmier dattier. Par conséquent, il provoque un dessèchement puis un dépérissement rapide des arbres. Le bayoud ou la fusariose du palmier dattier se caractérise par sa résistance à la sécheresse et par sa capacité de rester dangereux après plus de trente ans passés sous sol. Il est également très prolifique soit par le repiquage de rejets apparemment sains, soit par l'irrigation, soit par les vents de sables qui peuvent transporter de minuscules éléments végétaux (El Hadrami *et al.*, 1998).

#### **2.4.1- Dégâts de la fusariose**

Les espèces du genre *Fusarium* sont des pathogènes responsables des pertes économiquement importantes chez la majorité des cultures. Ces agents pathogènes peuvent causer la fonte de semis, la pourriture des racines et du collet (Pauvert, 1984). Ils attaquent tous les organes végétatifs et reproducteurs des plantes (Gargouri, 2003).

##### **2.4.1.1- Fonte de semis (Seedling blight)**

La fonte de semis est due à des semences contaminées et elle est fréquente dans les régions humides où la maladie de l'épi prédomine (Gargouri *et al.* 2001). Moins fréquemment, cette maladie peut être causée par l'inoculum présent dans le sol ce qui est généralement le cas des régions arides (Gargouri, 2003). La maladie peut se traduire par des manques à la levée. En effet, la germination a eu lieu mais les racines meurent au cours de leur développement ou elles sont partiellement nécrosées. La fonte de semis due au *Fusarium* se manifeste tardivement, elle est localisée dans les zones les plus sèches. Parfois, la maladie se traduit par le dessèchement brutal de jeunes plantules qui restent dressées. Dans le cas d'une infection sévère, les racines latérales avortent ou encore sont détruites dans un stade assez jeune (Mrabet, 1998). La fonte de semis est responsable d'une réduction de rendement qui peut atteindre 17% (Gargouri, 2003).

##### **2.4.1.2- Pourriture des racines (Root rot ou common root rot)**

La pourriture des racines appelée aussi la pourriture commune est une maladie qui apparaît chez les plantes âgées et se manifeste par une infection des parties souterraines. Elle est due à la présence de l'inoculum dans le sol, aux débris végétaux infectés ainsi qu'aux semences contaminées. L'infestation a lieu dans les régions où la pluviométrie est déficiente (Gargouri *et al.* 2001). La maladie cause la destruction des tissus des racines, du rhizome et de la partie souterraine de la tige. Les symptômes typiques se caractérisent par une coloration brune ou noire. Ce brunissement peut progresser vers le plateau de tallage et très peu vers la tige. Les symptômes peuvent se traduire, mais moins fréquemment que la pourriture du pied, en des épis blancs prématurés (Gargouri, 2003).

### 2.4.1.3- Pourriture du pied (Foot rot ou dry land foot rot)

La pourriture du pied est une maladie grave des grandes cultures, céréales et plantes fourragères, dans les régions arides et semi-arides pouvant occasionner des pertes élevées du rendement. Les conditions climatiques de la Tunisie par exemple favorisent le développement de cette maladie (sol sec quand les plantes sont jeunes). En effet, selon les travaux menés par Ghodbane *et al.*, (1974), les pertes du rendement dues à la fusariose étaient de l'ordre de 44%. Cette maladie est due principalement aux champignons présents dans le sol sous forme de chlamydospores, de mycélium et débris végétaux infestés enfouis dans la couche superficielle du sol. Les pathogènes pénètrent par le coléoptile, le rhizome ou les racines secondaires (Burgess *et al.*, 1981).

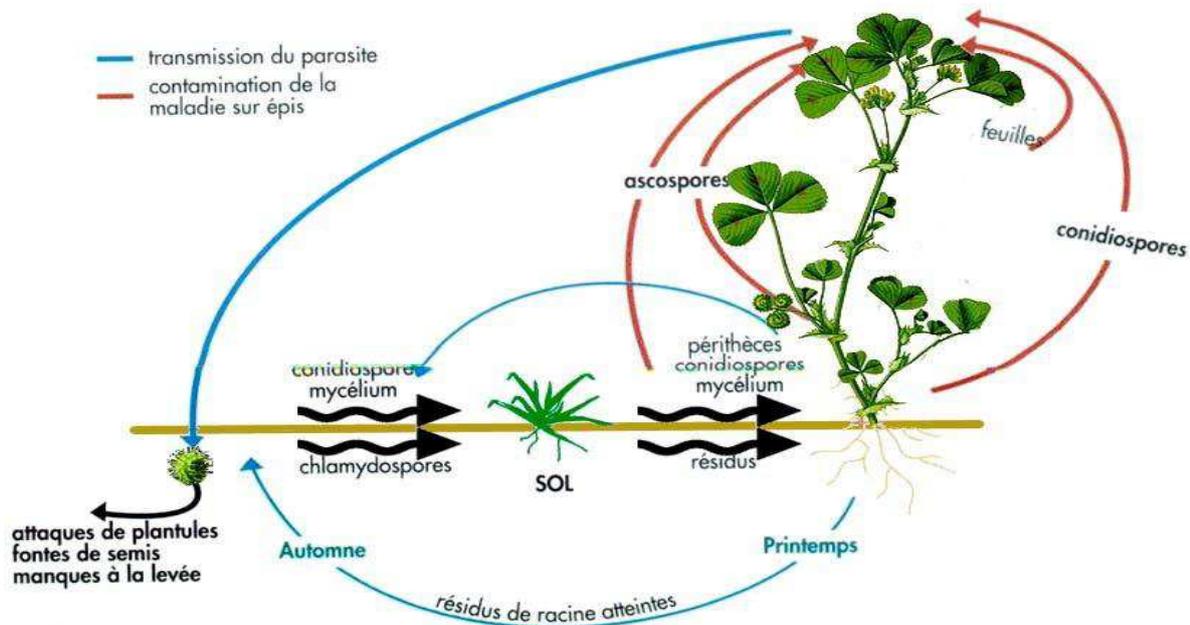
L'infection reste latente et ne se développe que si la plante se trouve dans les conditions de stress hydrique pendant ou juste après la floraison (Gargouri, 2003). Lorsque l'attaque du collet est précoce, le champignon peut attaquer les différentes gaines et détruire la jeune plante.

### 2.4.2- Cycle biologique de la maladie

Le *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 détruit 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 8). 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 8** Cycle de *Fusarium* spp. : Illustration des différents modes d'action (Caron, 2000)

### 2.4.3- Moyens de lutte contre La Fusariose

Différents moyens de lutte existent, cependant la prévention reste la meilleure arme contre les épidémies de fusariose en champ.

#### 2.4.3.1- Pratiques culturales

La production de spores infectieuses à partir des déchets végétaux présents dans les champs est la première étape du cycle infectieux de *Fusarium*. Il convient donc de ne pas réutiliser les déchets végétaux pour fumer les cultures.

Au niveau du semis, il est recommandé de semer les céréales dans un sol bien travaillé. Idéalement le sol doit favoriser une germination et une levée rapide. De cette manière la jeune plante peut être plus robuste pour faire face à une infection.

Une pratique d'alternance de culture apporte des effets bénéfiques compte tenu de la préservation nécessaire des ressources du sol. De plus, elle induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes. De plus la culture de variétés résistantes est à privilégier.

#### 2.4.4- Moyens de lutte biologique

De nombreux agents de bio-contrôle sont actuellement disponibles dans le commerce. Le principe repose sur l'hyper-parasitisme. Certains champignons sont des parasites d'autres champignons. C'est le cas pour de nombreuses espèces du genre *Trichoderma*. *T. harzianum* a été décrit comme capable de contrôler les pathologies induites par *F. oxysporum* sur le bananier (Thangavelu *et al.*, 2004).

#### 2.5- 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 ; Fujita *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) (Fujita *et al.*, 1994 ; Schirmböck *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996 ; Cooney *et al.*, 1997 ; Prieto *et al.*, 1997 ; Grondona *et al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek *et al.*, 2003).

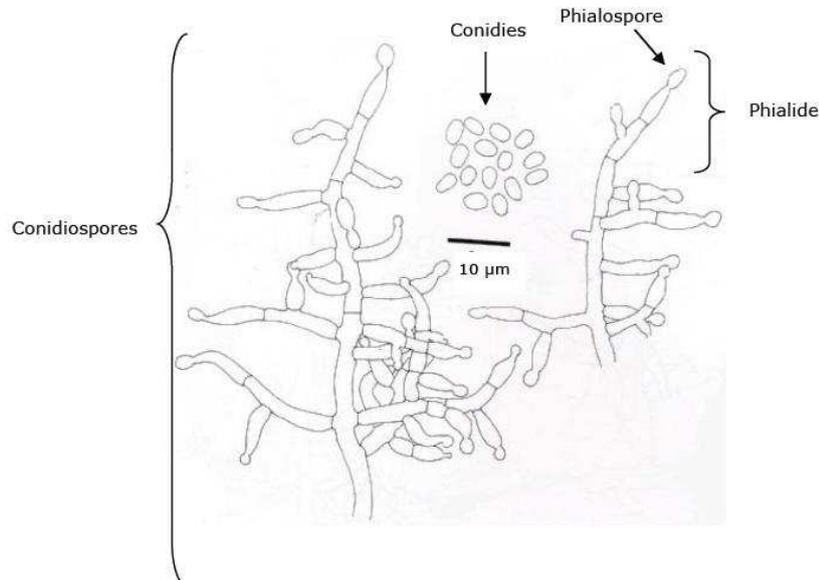
##### 2.5.1- Morphologie

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<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> 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 (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek *et al.*, 2003).



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

### 2.5.2- 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 cultureux 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 1821, Fries classa les *Trichoderma sp.* parmi les Gastéromycètes.

En 1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredit Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre.

En 1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques sous microscopie optique (surtout les phialides).

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 téléomorphes<sup>1</sup> 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* mitosporique\*\* (*Trichoderma*)**

\*\*Groupe important de champignons hétérogènes ayant pour caractéristique commune l'absence de stade sexué ([http ://www. Medicalglossary .org/fungi\\_ mitosporic \\_ fungi\\_ definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html)).

### 2.5.3- 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).

### 2.5.4- 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 attribué 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).

### 2.5.5- 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.

*Trichoderma* possède une batterie de mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. Le déploiement des modes d'action varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc...). ***Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive.** Il permet, au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines. Le même effet est observé lorsqu'il est utilisé en pulvérisation aérienne. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (caron, 2012).

#### **2.5.6- Production de métabolites intéressants**

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp.* a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et al., 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990).

La littérature ne cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp.* sont principalement des enzymes et des molécules bioactives. Le travail de thèse de Landreau (2001) ayant présenté une synthèse bibliographique sur ces groupes de produits, nous ne les citons ici que très succinctement :

- **Production d'enzymes**

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. Principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren et al., 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003).

### ➤ Production de substances bioactives

La production de métabolites secondaires par différentes espèces de *Trichoderma* est bien documenté. Il a été rapporté que *Trichoderma spp.* produire une large gamme de volatil et non volatil substances antibiotiques (Weindeling et Emerson, 1936 ; Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998 ; Vyas et Mathur, 2002) et deux de ces composés, à savoir, trichodermin et viridin produits par *Trichoderma sp.* inhibent la croissance des champignons pathogènes à des concentrations très faibles (Weindeling et Emerson, 1936, Weindeling, 1941). Les substances volatiles et non volatiles produites par *Trichoderma sp.* inhibe efficacement la croissance de *Rizoctonia solani* (Roy, 1977), *Sclerotium rolfsii* ( Upadhyay and Mukhopadhyay, 1983), et *Thanatephorus cucumeris* (Dubey et Patel 2001).

Un métabolite organique cristallin isolé à partir de *Trichoderma* qui inhibe *R.solani* à hautes dilutions a été identifié comme la gliotoxine (Weindeling 1941). Brain et McGowan (1945) ont décrit la production de viridin, un antibiotique très fongistatique par *Trichoderma viride*. Godtfrdsen et Vangedal (1965) ont rapporté la production de trichodermine, un métabolite terpénoïde par *Trichoderma*. selon Dennis et Webster (1971), *Trichoderma polysporum* produit également trichodermine, et *Trichoderma hamatum* produit des antibiotiques peptidiques. Ils ont aussi démontré l'action toxiques des métabolites de *Trichoderma* sur les espèces pathogènes de *Pythium* . Trichodermine-4 est un antibiotique produit par *Trichoderma lignorum* qui a été utilisé pour contrôler les maladies des plantes (fedorinichik *et al.*,1975).

Des isolats de *T.hamatum* produit des métabolites toxiques solubles dans l'eau et deux d'entre eux ont été identifiés comme isonitrile acides (Brewer et Taylor, 1981). Papavizas *et al.*(1982) ont utilisé plusieurs mutants de *T.harzianum* induits par les UV pour la production de métabolites secondaires. Ils ont obtenu deux métabolites non identifiés. de *T.harzianum* un est thermolabile et l'autre est thermostable. Stipanovic et Howell (1982) ont isolé un nouveau métabolite toxique, gliovirin de *Gliocladium virens* ( synonyme de *Trichoderma virens*) qui a été plus tard révélé actif contre *Pythium ultimum* (Howell et Stipanovic 1983). Pyrones antifongiques isolés du filtrats de culture de *T. harzianum* et *T. koningii* inhibé la croissance de nombreux agents pathogènes fongiques, y compris *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis var .tritici*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii* et *R. solani* ( Claydon *et al.*, 1987, Simon *et al.*, 1988). Un composé phénolique isolé de *T.harzianum* inhibe la germination des urédospores de l'agent pathogène de la rouille de l'arachide, *Puccinia arachidis* (Govindasamy et Balasubramanian, 1989).

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 démontré dans près de 80% de l'interaction Antagoniste pathogène (Monaco *et al.*, 1994). Une souche de *T. harzianum* isolé 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). DiPietro *et al.* (1993) obtenu de la gliotoxine à partir du filtrat de culture de *G.virens*, qui inhibe la germination de spores de *Botrytis cinerea*. Les isolats de *T. viride* *T. harzianum* et a inhibé la croissance de *Fusarium moniliforme* et *Aspergillus flavus* par la production de composés volatiles inhibitrices (Calistru *et al.*, 1997). Maladie coton de semis incité par *R. solani* a été supprimée par *T.viride* raison de mycoparasitisme et la production d'antibiotiques (Howell *et al.*, 2000). Les métabolites secondaires volatiles produites par *Trichoderma pseudokoningii*, *T.viride* et *T. aureoviride* affecté la croissance du mycélium et la synthèse des protéines dans deux isolats de *Serpula lacrymans* à des degrés divers (Humphirs *et al.*, 2002). Mais la production de métabolites non volatile 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). Mukherjee et Raghu (1997) ont étudié l'effet de la température sur la production de métabolites par *Trichoderma sp.* Ils ont observé que *Trichoderma* produit une forte concentration de de mycotoxines dans un bouillon de culture à des températures élevées. Cependant, *Trichoderma sp.* n'était pas efficace dans la suppression *S. rolfsii* à une température supérieure à 30 ° C. Mischke *et al.* (1997) ont mesuré l'efficacité des métabolites produits par *Trichoderma sp.* sur la base de l'inhibition de la croissance de *R. solani*. En outre, ils ont observé que les extraits aqueux de jeunes germes cultivés sous lumière de *T. virens* inhibent *R. solani* plus que les extraits de jeunes germes cultivés dans l'obscurité. En outre, ils ont montré que les extraits de *T. virens* cultivées sous faible pH ont montré une activité inhibitrice accrue. En 2001 Landreau, a identifié des métabolites polypeptidiques ; des peptaïbols et des ciclosporines à effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoire. Des métabolites non volatils diffusibles : polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines sont identifiés par Blumenthal, en 2004. Des métabolites volatils, le 6 pentyl-pyrone, l' éthylène et le cyanure d'hydrogène, des alcools et des aldéhydes ont été purifiés et

identifiés par Vizscaino et son équipe en 2005. Vinale *et al.* (2006) ont isolé des métabolites secondaires à partir de deux souches de *T. harzianum* commercialisés, T22 et T39, pour la première fois. Trois principaux composés bioactifs ont été produits par des souches T22, dont l'un est un nouveau azaphilone qui a montré une activité antifongique remarquable contre *R. solani*, *P. ultimum* et *G. graminis var. tritici* dans des conditions *in vitro*.

### 3. Matériel et Méthodes

Le présent travail porte sur la lutte biologique contre l'agent pathogène de la fusariose, "*le Fusarium*". L'objectif principal de ce travail, est l'isolement de l'agent pathogène à partir de différents organes et grains de plantes infectés, 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* » a été réalisé à partir de plusieurs régions représentant différentes Wilayas de l'Algérie. Les échantillons utilisés pour cet objectif sont: les grains de maïs, les grains de blé, les gains des haricots, les feuilles et les racines des palmiers, et les tiges des oliviers. Le tableau 2 récapitule les sites et la période d'échantillonnage.

**Tableau 2** Sites et période d'échantillonnage

Plantes	Site d'échantillonnage	Année
Maïs	Hamma Bouziane (Constantine)	Janvier 2010
Palmier, Feuilles	Tolgua (Biskra)	Mars 2010
Olivier	Sétif	Mars 2011
Palmier, Racines	Ben madhi (Gardaya)	Avril 2012
Haricot	Constantine	Juin 2012
Blé	El-khroub (Constantine)	Juillet 2012

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.*, 1999).

### **3.1.2- 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).

### **3.1.3- 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 Guarro, 1995 ; 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).

#### **3.1.3.2- Etude par voie moléculaire**

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes et outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) (Reiss *et al.*, 1998; Peterson, 2006). Dans le présent travail, l'identification des isolats fongiques a été effectuée au niveau du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA), Tunisie, selon les étapes suivantes:

### **a- Extraction de l'ADN fongique**

Des tubes Eppendorf de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium fongique. Un volume de 500 µl de tampon de lyse (annexe 1) est ajouté au broyat. Après homogénéisation du mélange avec une pince en bois, le mycélium est mis en incubation pendant 30 minutes à 1 heure au bain- marie à 65°C.

Les protéines sont éliminées par un traitement au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (volume égal à celui du tampon de lyse). Après homogénéisation du mélange et centrifugation (15 min à 13000g), la phase supérieure aqueuse est récupérée (environ 400µl) et l'ADN est précipité sélectivement en présence de 10% (40 µl) d'acétate de sodium (3 M à pH 8) et avec un volume de 0,54 (216 µl) d'isopropanol pour ne pas précipiter les polysaccharides.

Après une nouvelle centrifugation (3min à 12000g), le surnageant est retiré et le culot d'ADN est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 300 µl de tampon TE puis placé à 65°C jusqu'à dissolution complète. L'ADN dissout est traité avec 3 µl de ribonucléase A (concentration finale: 100 µg/ml) pendant 1 heure à 37 °C. L'ADN est ensuite précipité de nouveau avec 30 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 8) en présence de 600 µl d'éthanol pur (conservé à -20°C), le culot est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 % puis séché au " Speed vac " pendant 15 à 20 min.

L'ADN est ensuite repris dans 100 µl de TE, maintenu une nuit à 4°C (pour dissoudre l'ADN) puis conservé à -20.

### **b- Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

- **Principe**

La technique de la PCR consiste en une amplification enzymatique *in vitro* d'un segment d'ADN, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires des séquences en 5' et 3' du segment à amplifier. Ce segment est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives. Cette technique est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C (Saiki *et al.*, 1985; Mullis et Faloona, 1987).

La réaction d'amplification nécessite, outre la présence de l'ADN utilisé comme matrice et la Taq polymérase, l'utilisation de deux oligonucléotides (amorces) qui s'hybrident avec les

séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier, et des déoxynucléotides triphosphates (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) nécessaires à la synthèse de nouveaux brins d'ADN. La réaction d'amplification s'opère au cours d'une succession de cycles de températures sur le mélange réactionnel adéquat.

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN bicaténaire à amplifier (92°C - 95°C)
- Hybridation ou appariement des amorces sur la région complémentaire (varie selon les  $T_m$  des amorces).
- Extension ou polymérisation à partir des amorces des brins d'ADN. On se place généralement à 72°C.

Un certain nombre de cycles d'amplification (en général 30) est effectué et chaque cycle permet de doubler la quantité d'ADN à amplifier, entraînant une accumulation exponentielle de l'ADN amplifié de  $2^n$  ; (n étant le nombre de cycle d'amplification).

Dans ce travail, la PCR a été adoptée pour amplifier les ITS (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs internes transcrits) de l'unité ribosomique des différentes souches.

Deux amorces universelles ITS1 et ITS4 ont été utilisées, il s'agit de:

**ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ( $T_m= 58^\circ\text{C}$ )**

**ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC ( $T_m=65^\circ\text{C}$ )**

- **Protocol de la réaction PCR**

La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 25  $\mu\text{l}$  du mélange suivant:

- Tampon de la réaction IOX 5  $\mu\text{l}$
- TamponMg1.5  $\mu\text{l}$
- une solution des différents désoxyribonucléotides triphosphates notée:
  - dNTPs (10 mM) 0.3  $\mu\text{l}$
  - ITS1 (20 pmoles/ $\mu\text{l}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$
  - ITS4 (20 pmoles/ $\mu\text{l}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$
  - H<sub>2</sub>O ultra pure 17.5  $\mu\text{l}$
  - Taq polymérase 0.22  $\mu\text{l}$
  - ADN 1  $\mu\text{l}$

Dans un premier temps un mélange ou mix est réalisé pour un nombre n de tubes, puis réparti à raison de 23  $\mu\text{l}$ /tube. L'ADN (2  $\mu\text{l}$ ) est ajouté en dernier au mélange réactionnel

- Les cycles de température

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de température réalisés sur un thermocycle.

Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 95°C pendant 5 min, puis suit une série de 30 cycles, chaque cycle se déroulant de la manière suivante:

95°C pendant 30 secondes, Dénaturation.

55°C pendant 30 secondes, Hybridation des amorces.

72°C pendant 1 minute, Extension ou polymérisation.

Ensuite suit un dernier cycle de 72°C pendant 15 minutes pour achever la polymérisation.

#### **a. Electrophorèse des acides nucléiques**

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel horizontal d'agarose à 1,4% additionné de bromure d'éthidium (1µl/20 ml de gel). Cette électrophorèse se fait dans un tampon TEB (80 mM Tris-HCl pH 8 ; 2,5 mM EDTA ; 89 mM acide borique), pendant 2h 30 à 3h sous 120 volts. Les bandes amplifiées sont visualisées sous UV (312 nm).

La taille des différents fragments est déterminée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire.

#### **b. Analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques**

La comparaison des séquences avec celles des bases de données a été réalisée via l'algorithme BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Les alignements des séquences nucléotidiques ont été réalisés grâce au logiciel Chromas (Thompson *et al.*, 1994).

#### **c. Analyse phylogénétique**

L'analyse phylogénétique consistait à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre des substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est fiable. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus.

### **3.2- Isolement et identification de l'agent antagoniste**

#### **3.2.1- Site de prélèvement**

Dans ce travail, l'agent antagoniste a été isolé à partir du sol de différentes régions du Sud et de l'Est Algérien, il s'agit du:

- sol agricole de la région de Tolgua (Wilaya du Biskra) ;
- sol agricole de la région de Ben Madhi (Wilaya de Ghardaya) ;
- sol agricole de la région de Baarawiya , El-khroub (Wilaya de Constantine) ;
- sol agricole de la région de Karkra (Wilaya de Collo).

### **3.2.2- 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).

### **3.2.3. Isolement des microorganismes antagonistes**

L'isolement des microorganismes 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, pour sélectionner les champignons, et sur gélose nutritive (GN) pour sélectionner les bactéries. Les préparations sont incubées à 28-30°C jusqu'au développement apparent de colonies (Botton *et al.*, 1990). En outre, d'autres boîtes contenant les milieux précédents sontensemencées par des grains des sols sans passer par la suspension et les dilutions.

### **3.2.4. Purification et conservation des isolats**

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

### 3.2.5. Sélection des isolats antagonistes vis-à-vis du *Fusarium*

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

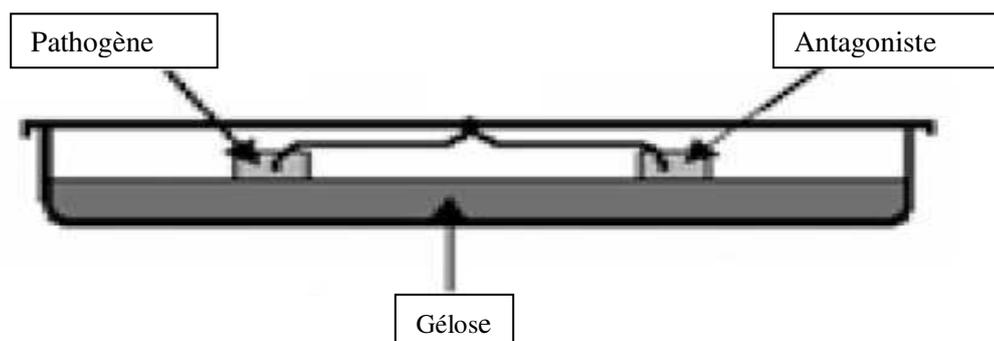
Pour ce faire, Un écouvillon stérile trempé dans la suspension sporale ( $4.10^4$  spore/ml) des souches de *Fusarium* a servi à ensemercer uniformément toute la surface des boîtes contenant la gélose PDA et GN. Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 5 mm de diamètre des isolats purs et jeunes sont déposés sur la gélose précédente. Après deuxième séchage, les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant 6 jours pour les moisissures et 1 à 3 jours pour les bactéries et les levures. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre près (Prescot, 1995 ; Madigan *et al.*, 1997).

Les isolats présentant une forte activité antifongique vis-à-vis du *Fusarium*, ont subis des tests d'antagonismes de confirmation approfondie, en appliquant deux autres différentes méthodes à savoir:

- la confrontation par contacte directe
- la confrontation à distance

#### 3.2.5.1- 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 *Fusarium* *sp.*. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (figure 10) ; les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28 °C pendant six jours (Hibar *et al.*, 2005).



**Figure 10** 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<sub>n</sub> est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste ;

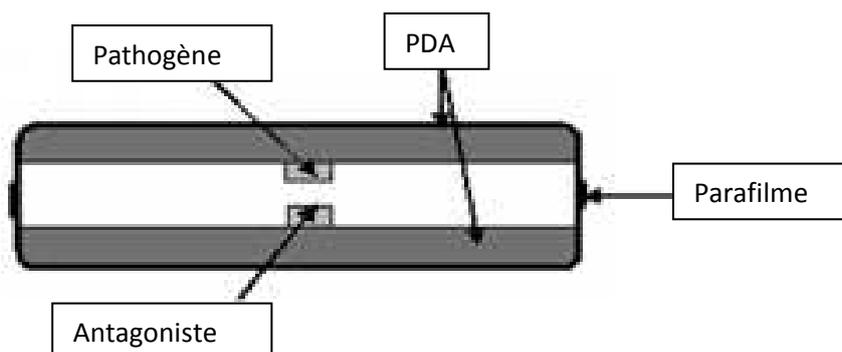
C<sub>o</sub> est le diamètre moyen des colonies témoins.

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.

### 3.2.5.2- 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 *Fusarium* en haut (figure 11). 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 11** Confrontation à distance entre *Fusarium* et les antagonistes.

- **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 *Fusarium*, alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA.

### **3.2.6- Identification des isolats sélectionnés**

Dans cette partie l'identification est effectuée juste pour les isolats montrant une forte activité antagoniste vis à vis du *Fusarium*. L'identification repose sur l'analyse des critères macroscopiques et microscopiques.

**NB :** Les critères d'identification adoptés ci-dessous, concernent ceux des moisissures, puisque tous les antagonistes sélectionnés appartiennent aux champignons filamenteux.

#### **3.2.6.1. Critères d'identification macroscopique**

D'après Guiraud, (1998) les principaux caractères cultureux à étudier sont : la vitesse de croissance des colonies, la couleur des colonies, leur variation en fonction du temps, la texture de la surface, la couleur de l'envers des boîtes, l'odeur des colonies et le changement de la couleur du milieu utilisé. Pour cet objectif, quatre milieux de cultures ont été utilisés: PDA, Sabouraud, MEA et Czapeck Dox (annexe 1).

#### **3.2.6.2. Critères d'identification microscopique**

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au lactophénol Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 suffit pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

Les critères d'identification microscopique sont: le thalle (septé ou siphonné) (Badillet *et al.*, 1987), l'aspect, la forme et la taille des spores, et la présence ou l'absence des formes protectrice (les chlamydospores).

- **Identification par la technique de scotch (ou technique de drapeau)**

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes

de lactophénol (Chabasse, 2002). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements x40.

### **3.2.6.3. Identification par voie moléculaire**

Les étapes de l'identification moléculaire des souches antagonistes, sont les mêmes réalisées pour les souches pathogènes (voir partie étude moléculaire de l'agent pathogène).

## **3.2.7. Effet du pH sur le développement des souches antagonistes**

### **3.2.7.1- Effet du pH sur milieu liquide (Technique du microplaque- BIOLOG)**

#### **\* Le système BIOLOG**

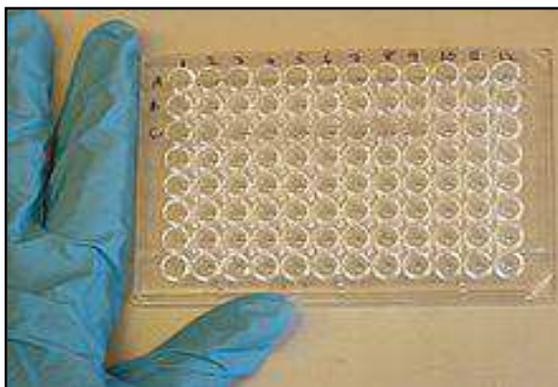
Le système BIOLOG, appelé aussi GENIII Microplaque, est un panel de tests permettant l'identification de plus de 2500 espèces de bactéries, levures et moisissures. Ce système d'identification sur plaques donne des résultats rapides, en 4 à 24 heures pour les microorganismes et en moins de 48 heures pour les cellules de mammifères.

Le Phénotypage Microarrays couvre les applications de recherche en biologie cellulaire et génétique: cancérologie, cellules souches, toxicologie et optimisation de bio-process.

L'Omnilog et la MicroStation sont des automates assurant l'incubation, la lecture des plaques et l'interprétation et la comparaison des phénotypes cellulaires.

#### **\* Principe du BIOLOG**

Le BIOLOG est une technologie prometteuse, elle se base sur des ensembles de plaques de microtitrage à 96 puits (figure 12). Chaque puits, contenant un milieu de culture de cellule différentes, est conçu pour tester une fonction unique (activité enzymatique, activité protéique, effet antagoniste, etc.) ou de phénotype cellulaire (identification biochimique, tolérance aux différentes sources de carbone, de sucre, d'azote ou autre, tolérance aux différents pH ou salinité, etc.).



**Figure 12** Plaques de micro titrage à 96 puits.

Après inoculation avec une suspension de cellules, les microplaques sont placées dans un incubateur-lecteur Omnilog (figure 13) et le comportement phénotypique est enregistré par une caméra CCD.

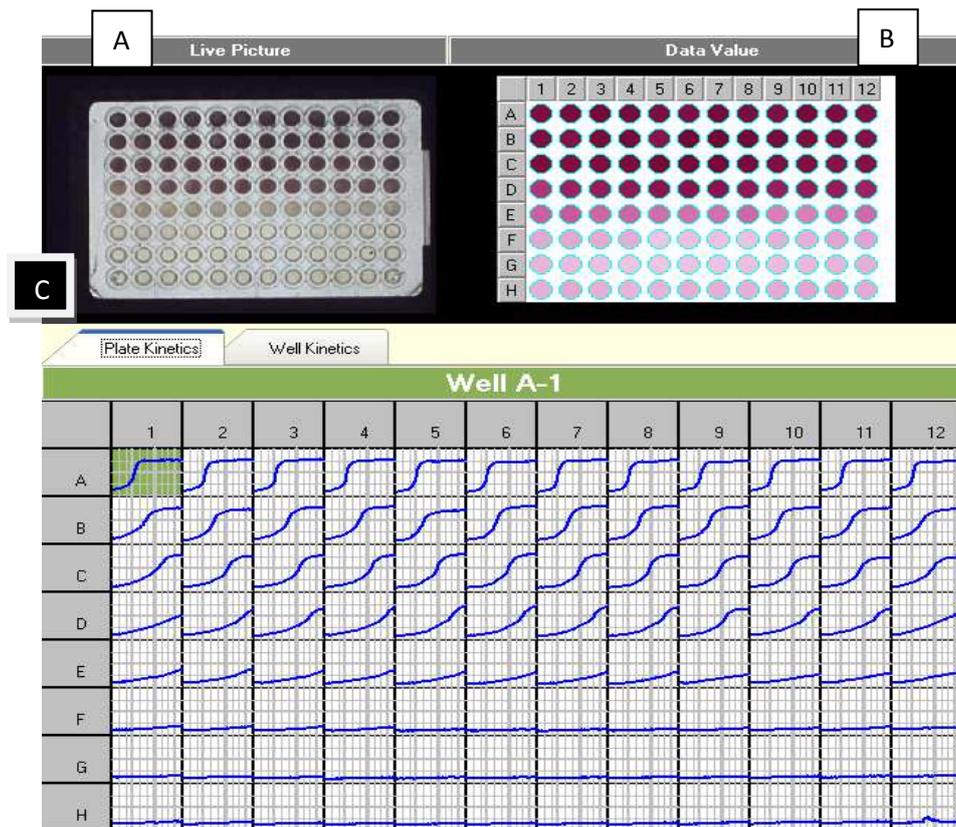


**Figure 13** System BIOLOG.

La réponse des cellules dans chaque puits est surveillée par colorimétrie, en utilisant une chimie redox brevetée qui intègre la respiration des cellules au cours du temps.

Le résultat observé, est un changement de couleur, d'incolore à violet. Si les cellules présentent un phénotype attendu et peuvent se développer dans un puits, ils respirent normalement pour donner une couleur violette foncée. Si le phénotype et la croissance sont faibles, ils respirent plus lentement et donnent une couleur violette claire. Enfin, si le phénotype et la croissance sont négatifs, le bien reste incolore.

Le suivi de la réaction est réalisé à l'aide de système Omnilog de l'appareil Biolog couplé à un ordinateur. Le système Omnilog interprète les résultats sous trois formes: une photo réelle de la plaque, une schématisation de la photo réelle et une cinétique de développement de chaque souche dans chaque puits (figure 14).



**Figure 14** Résultats de BIOLOG: (A) photo réelle de la plaque ; (B) photo significative ; (C): cinétique de développement des cellules testées.

#### \*Test de pH sur microplaque

Le milieu de culture utilisé pour ce test est le milieu Sabouraud liquide (annexe 1), préparé avec différentes valeurs de pH allant de 2 jusqu'à 9.

Les suspensions de spores des champignons antagonistes sont obtenues à partir de cultures âgées de sept jours. Ces solutions mères sont diluées et calibrées à l'aide de la cellule de Malassez, à une concentration de  $4.10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup> pour les champignons filamenteux.

Un volume de 233 µl du milieu Sabouraud et de 17 µl de la solution sporale, est introduit dans chaque puits des microplaques. Ces dernières sont incubées à 28°C pendant 5 jours.

Le suivi de la réaction est réalisé à l'aide de système Omnilog de l'appareil Biolog couplé à un ordinateur.

#### \* Test de pH sur boîte

Le milieu utilisé pour cet objectif est le milieu PDA (annexe 1), préparé à différents pH allant de 2 jusqu'à 9 avec une addition de 1. Chaque souche antagoniste, a été ensemencée sur des

boîtes de Pétri contenant le milieu indiqué, avec les différents degrés de pH. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 6 jours.

### **3.3. Test de l'activité enzymatique des souches antagonistes**

L'activité antifongique, observée par les souches antagonistes peut être due à la production d'enzymes extracellulaire, pour ce faire, une série des tests enzymatiques a été effectuée, afin de vérifier cette hypothèse. Il s'agit des tests de production de chitinase, de protéase, de cellulase et de lipase.

#### **3.3.1- Activité chitinase**

L'activité chitinolytique des souches antagonistes est testée selon la méthode de Kotasthane et Agrawal, (2009). Un ensemencement des cultures jeunes des souches antagonistes a été effectué sur un milieu de culture à base de chitine (annexe 1), coulé sur des boîtes de Pétri. Les préparations sont incubées à 25°C pendant 3 à 4 jours. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo rouge autour des colonies.

#### **3.3.2- Activité protéase**

L'activité protéolytique des souches antagonistes a été testée sur un milieu à base de lait (annexe 1), coulé sur des boîtes de Pétri. Après incubation à 25°C pendant 3 à 4 jours. L'apparition d'un halo transparent autour des colonies signifie la présence de l'enzyme protéase.

#### **3.3.3- Activité cellulase**

La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (en poudre à 0.5%) comme seule source carbonée (annexe1). La production de l'enzyme cellulase se traduit par l'apparition d'une nette zone de lyse sur le milieu de culture.

#### **3.3.4- activité lipase**

L'activité lipolytique des souches antagonistes, a été étudiée selon la méthode de Haliru et Bukola, 2012. La technique consiste à repiquer les souches antagonistes sur un milieu à base

d'huile (annexe 1). La production de l'enzyme lipase se traduit par l'apparition d'un halo transparent au tour des colonies.

### **3.4. Production et extraction des molécules bioactives élaborées par les antagonistes sélectionnés**

Sur un autre volet, la production de molécules bioactives à partir des souches de *Trichoderma*, a été effectuée par fermentation sur milieu liquide. La mise en évidence de l'activité antifongique de ces molécules, a été réalisée en testant le filtrat de fermentation dans son état brute et après avoir fait une extraction par du chloroforme.

#### **3.4.1- Production de métabolites secondaires par fermentation**

La production des métabolites secondaires, par les souches antagonistes, et la mise en évidence de leur activité antifongique, a été effectuée selon le protocole de Dennis et Webster, (1971). Le milieu de fermentation utilisé pour cet objectif est celui de PDB (annexe 1). Dix fioles de 250ml, contenant 100ml du milieu PDB, ont été inoculées par quatre disques de culture âgée de 7 jours pour chaque souche, et incubées à 28°C pendant 15 jours. Après fermentation, cinq fioles de chaque souche ont servis pour faire des tests d'antagonisme, *in vitro*, vis-à-vis des souches de *Fusarium*, tandis que les cinq cultures restantes ont été utilisées pour effectuer l'extraction des métabolites secondaires.

#### **3.4.2- Mise en évidence de l'activité antifongique des surnageants de culture**

Afin de tester l'activité antifongique des surnageants de cultures, le contenu des fioles de fermentation a été filtrées à travers du papier Whattman N°1, afin de séparer le mycélium du milieu de culture supposant contenir les molécules bioactives. Le surnageant, ainsi, obtenu a été filtré à travers des filtres millipores stériles de 25µm de diamètre.

Un volume égal de PDA fondu à 45°C est ajouté au filtrat de chaque souche, afin d'obtenir une concentration finale de 50% (v/v).

Le milieu de culture contenant le surnageant à tester, est versé dans des boîtes de Pétri et inoculé, après solidification, avec des disques de pathogènes de 3mm de diamètre. Un suivi du développement de l'agent pathogène est effectué chaque 24 heures et ce, pendant 6 jours.

**NB:** Ce test a montré un changement de couleur (décoloration) de l'agent pathogène, ensemencé avec le surnageant de culture de l'agent antagoniste, ce qui nous a laisser supposer

que ces souches antagonistes peuvent produire l'enzyme laccase, responsable de la décoloration du mycélium fongique. De ce fait, un test de production de l'enzyme laccase a été effectué.

➤ **Test de production de laccase**

La production de laccase s'effectue sur gélose PDA additionnée à une concentration de 0.4% de 2,6- Diméthoxyphénol (DMP). Les colonies des souches antagonistes en question, âgées de 6 jours, sont déposées soigneusement au centre des boîtes de Pétri, contenant le milieu précédent. La production de laccase se traduit par la formation d'un halo orange autour de la colonie fongique.

### **3.4.3- Extraction des molécules bioactives**

Un volume identique de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) est ajouté dans chaque Erlen contenant la culture fongique de 15 jours, le tout est bien mélangé à l'aide d'un ultraturrax. Le contenu des Erlen est filtré sur papier Whatman N°1. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décantation pour séparer la phase aqueuse de la phase chloroformique.

L'éluent, contenant les métabolites secondaires, est recueilli puis évaporé à une température de 40°C en utilisant l'appareil rotatif évaporation sous vide. Enfin, le résidu est recueilli de nouveau à l'aide du DMSO.

### **Test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques des souches antagonistes**

#### **\* Test par BIOLOG**

À partir d'une solution mère de concentration de 50 mg.ml<sup>-1</sup> (50 mg d'extrait dans 1ml du solvant DMSO), on procède à une série de dilution en progression géométrique de raison 2, de manière à obtenir une gamme de concentration finale dans les puits, comprises entre 50 et 1 mg.ml<sup>-1</sup> (50µl, 25µl et 1µl). Les suspensions de spores des champignons pathogènes sont obtenues à partir de cultures âgées de sept jours. Ces solutions mères sont diluées et calibrées à l'aide de la cellule de Malassez à une concentration de 4.10<sup>4</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>.

Un volume de 213µl de bouillon Sabouraud, un volume de 25µl d'une dilution de l'extrait et un volume de 13µl de la suspension de spores fongiques est introduit dans chaque puits de la microplaque (volumes indiqués par l'équipe du LMBA).

Des contrôles négatifs sont réalisés en utilisant le solvant DMSO. Les microplaques sont incubées à 28°C pendant 5 jours. Le suivi de la réaction est réalisé à l'aide du système Omnilog comme il a été décrit ci-dessus (voir principe du Biolog).

**\* Test par la technique des disques imbibés**

Le test de l'activité antifongique des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces de *Fusarium* isolées.

Un écouvillon stérile trempé dans la suspension sporale ( $4.10^4$  spore/ml) des souches de *Fusarium* a servi à ensemercer uniformément toute la surface de la boîte de gélose PDA. Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 5 mm de diamètre du papier Wattman imbibés avec 50µl de l'extrait à tester à différentes concentrations, sont séchés et déposés sur la surface des boîtes. Ces dernières, sont incubées à 28°C pendant 6 jours. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre près (Prescot, 1995; Madigan *et al.*, 1997).

## **4. Résultats**

Le présent travail porte sur l'isolement et l'identification de microorganismes, possédant une activité antifongique vis-à-vis d'un phytopathogène très répandu en Algérie, le *Fusarium*. L'isolement des souches pathogènes est effectué à partir de plantes infectées, tandis que l'isolement des agents antagonistes est effectué à partir de différents sols agricoles.

### **4.1. Isolement et identification de l'agent pathogène**

#### **4.1.1. Isolement de l'agent pathogène**

L'isolement de l'agent pathogène « *Fusarium* » a été réalisée à partir de différents organes et grains de plantes infectées, prélevées à partir de différentes régions en l'occurrence: Hamma Bouziane (Constantine), Tolgua (Biskra), Setif, Ben madhi (Gardaya), El-khroub (Constantine).

Les cultures réalisées à partir des différents échantillons à savoir: grains de maïs, grains de blé, gains des haricots, feuilles et racines des palmiers, et tiges des oliviers, ont aboutit à divers aspects, textures et couleurs de colonies. Sur la base des caractéristiques du *Fusarium* que nous recherchons, huit isolats ont été sélectionnés et purifiés.

#### **4.1.2. Identification des isolats**

##### **4.1.2.1. Identification morphologique**

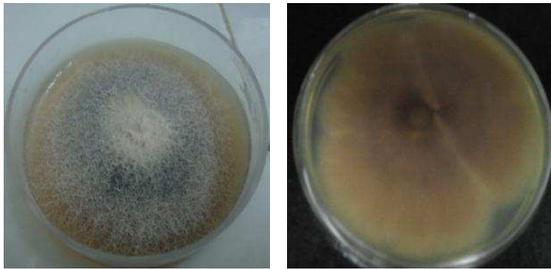
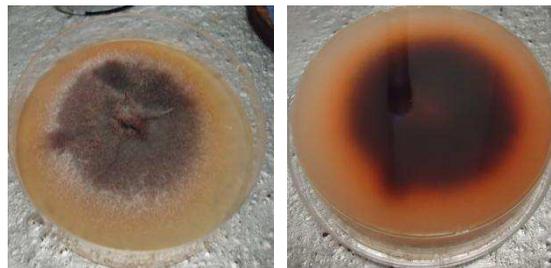
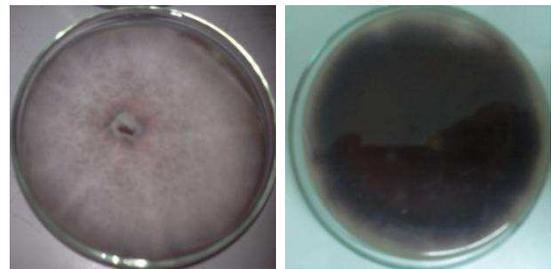
- **Etude macroscopique**

Les caractères macroscopiques des différents isolats sélectionnés ont été étudiés sur milieu PDA le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le tableau 3 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.

- **Etude microscopique**

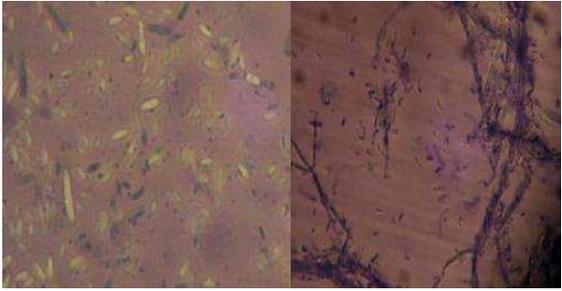
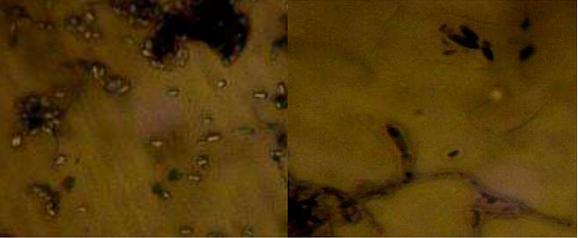
L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des huit isolats pathogènes sélectionnés (conidiophores, conidies, mycélium etc...). Les différents aspects microscopiques des isolats en question, sont récapitulés dans le tableau 4.

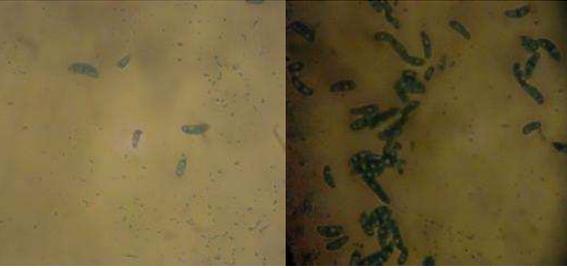
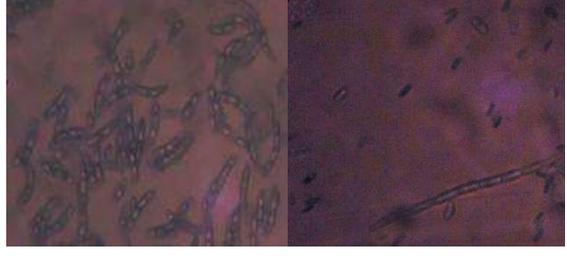
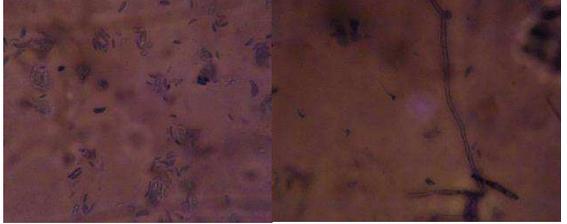
**Tableau 3** Observations macroscopiques des différents isolats pathogènes obtenus.

Plante	Code isolats	Observation macroscopique	Caractères macroscopiques
Maïs (Grains)	F1		- colonie laineuse blanchâtre, violette au centre, - revers violet
Maïs (Grains)	X' F2		- colonie laineuse violette; blanche au bordure. - revers violet, et orange au bordure.
Olivier (Tiges)	FO F3		- colonie laineuse blanche à bordure rouge. -revers rouge.
Haricot (Grains)	FH F4		- colonie aplatie blanche, violette au centre. - revers incolore violet au centre.
Haricot (Grains)	FGH F5		- colonie aplatie, violette, - revers violet. -changement de couleur du milieu au violet foncé à cause des sécrétions de la souche.

<p><b>Palmier (Feuille)</b></p>	<p><b>FP2 F6</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- colonie aplatie, blanche.</li> <li>- revers rouge orange.</li> </ul>
<p><b>Palmier (Racines)</b></p>	<p><b>Rpal F7</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- colonie aplatie, blanche à bordures jaunes.</li> <li>-revers incolore</li> </ul>
<p><b>Blé (Grains)</b></p>	<p><b>FGB F8</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- colonie aplatie, blanche et violette à revers violet.</li> </ul>

**Tableau 4** Description de l'aspect microscopique des isolats pathogènes sélectionnés.

Plante	Codes isolats	Aspect macroscopique sur milieu PDA	Caractères microscopiques
<p><b>Maïs (Grains)</b></p>	<p><b>X F1</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé,</li> <li>- macroconidies fusiformes, peut ou pas courbées, pluriseptées (3 à 7 septums).</li> <li>- microconodies ovoïdes, 0 à 2 septums,</li> <li>- absence de chlamydospores</li> </ul>
<p><b>Maïs (Grains)</b></p>	<p><b>X' F2</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>-filament septé,</li> <li>-macroconidie fusiformes pluriseptées pointue à l'extrémité.</li> <li>-absence de chlamydospores</li> </ul>

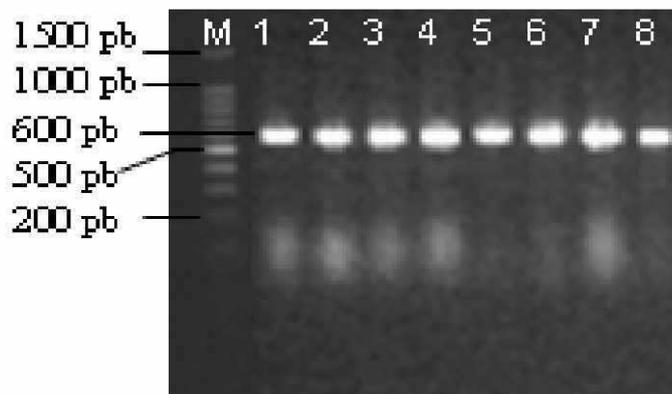
<p><b>Olivier (Tiges)</b></p>	<p><b>FO F3</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé,</li> <li>-conidies fusiformes, courbées, pluriseptées.</li> <li>- absence de chlamydospores.</li> </ul>
<p><b>Haricot (Grains)</b></p>	<p><b>GH F4</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>- macroconidies fusiformes, peut ou pas courbées, pluriseptées.</li> <li>- microconodies ovoïdes, 0 à 2 septums,</li> <li>- présence de chlamydospores terminales</li> </ul>
<p><b>Haricot (Grains)</b></p>	<p><b>FGH F5</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament sépté.</li> <li>- conidies ovoïdes , 0-3 septums.</li> <li>- absence de chlamydospores.</li> </ul>
<p><b>Palmier (Feuille)</b></p>	<p><b>FP2 F6</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>- conidie fusiforme ou ovoïdes, pluriseptées,</li> <li>- présence de chlamydospores terminales ou intercalaires.</li> </ul>
<p><b>Palmier (Racines)</b></p>	<p><b>Rpal F7</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>-macroconidies géantes, allongées; pluriseptées, pointues à l'extrémité.</li> <li>- présence de chlamydospores intercalaires.</li> </ul>
<p><b>Blé (Grains)</b></p>	<p><b>FGB F8</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filaments septés.</li> <li>- absence de microconidies</li> <li>-macroconidies fusiforme géantes, pluriseptés (4-6).</li> </ul>

Les constatations faites, à partir des études macroscopiques et microscopiques, nous ont orienté vers le genre *Fusarium* et ce, pour les huit isolats phytopathogènes obtenus. La confirmation de cette hypothèse a été faite par le séquençage des gènes 16S rDNA des souches en questions.

#### 4.1.2.2. Etude moléculaire

##### a. Extraction de l'ADN fongique

L'ADN codant pour les ARN ribosomiaux 18S des isolats, extrait et amplifié, est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les bandes d'ADN obtenues correspondent à celle de 600 paires de base du marqueur du poids moléculaire (figure 16). Les produits PCR obtenus ont été séquencés et comparés, par la suite, aux séquences, des autres microorganismes, enregistrées au niveau de la base de données Genbank. L'analyse des séquences d'ARNr 18S des souches fongiques a permis d'affilier les huit souches pathogènes et d'aboutir à une identification définitive (tableau 5). En effet, les huit souches pathogènes appartiennent à 3 espèces de *Fusarium* en l'occurrence; *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*.



**Figure 15** Séparation sur gel d'agarose (1.5%) des produits d'amplification par PCR des ADN des isolats de *Fusarium*.. M: marqueur de poids moléculaire 100 pb, pistes 1-8 (isolats pathogènes, 1 : F1, 2: F2, 3: F3, 4: F4, 5: F5, 6: F6, 7: F7, 8: F8).

**Tableau 5** Affiliation phylogénétique des isolats pathogènes (paires d'amorces universelles)

Souches	CODES	Blast ncbi	Numéro d'accession	% identité
F1	X	<i>Fusarium verticillioides</i>	KF494135.1	99
F2	X'	<i>Fusarium verticillioides</i>	KJ699109.1	100
F3	FO	<i>Fusarium solani</i>	LN828145.1	100
F4	GH	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF864555.1	99
F5	FGH	<i>Fusarium solani</i>	LN828145.1	100
F6	FP2	<i>Fusarium solani</i>	LN828145.1	100
F7	Rpal	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC329616.1	100
F8	FGB	<i>Fusarium oxysporum</i>	<u>KJ938022.1</u>	100

## 4.2. Isolement et identification de l'agent antagoniste

### 4.2.1. Isolement des microorganismes antagonistes

L'isolement des microorganismes, réalisé selon la méthode de suspension- dilution (dilutions plates), a aboutit à la sélection de 81 isolats dont 19 sont des bactéries, 8 sont des levures et 54 sont des moisissures, répartis comme suit:

- 6 isolats bactériens, 2 levures et 15 isolats fongiques à partir du sol agricole de la région de Tolgua (Wilaya du Biskra);
- 4 isolats bactériens et 9 isolats fongiques à partir du sol agricole de la région de Ben Madhi (Wilaya de Gardaya);
- 4 isolats bactériens, 1 levure et 17 isolats fongiques à partir du sol agricole de la région de Baarawiya , El-khroub (Wilaya de Constantine);

- 5 isolats bactériens, 5 levures et 13 isolats fongiques à partir du sol agricole de la région de Karkra (Wilaya de Collo).

#### **4.2.2. Sélection des isolats antagoniste de *Fusarium***

La mise en évidence de l'activité antifongique des isolats purifiés consiste à rechercher leur effet antagoniste sur le développement des espèces de *Fusarium* isolées. En effet, cette étude a été faite *in vitro* selon la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats montrent que parmi les 81 isolats obtenus, uniquement 7 isolats fongiques sont dotés d'une forte activité antagoniste vis-à-vis des souches test de *Fusarium*.

Ces isolats antagonistes sont répartis, selon leur site d'isolement, comme suite:

- 4 isolats fongiques à partir du sol agricole de la région de Tolgua (Wilaya du Biskra) codés par: T1, T1", T1"x et T2;
- 1 isolat fongique à partir du sol agricole de la région de Ben Madhi (Wilaya de Gardaya) codé par: TB;
- 1 isolat fongique à partir du sol agricole de la région de Baarawiya, El-khroub (Wilaya de Constantine) codé par: Th
- 1 isolat fongique à partir du sol agricole de la région de la région de Karkra (Wilaya de Collo) codé par: TC.

La confirmation de ces résultats a été faite par deux autres méthodes à savoir: la confrontation par contacte directe et la confrontation à distance.

#### **4.2.3 La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches sélectionnées**

Les prélèvements réalisés à partir du sol, ont permis de mettre en évidence au laboratoire, la présence d'agents antagonistes vis-à-vis de différentes espèces de *Fusarium*, pouvant inhiber ou limiter la croissance de ces moisissures .

L'activité antagoniste, *in vitro*, des souches sélectionnées vis-à-vis du *Fusarium* a été étudiée selon deux méthodes:

- la confrontation par contacte directe
- la confrontation à distance

#### 4.2.3.1. Antagonisme par confrontation directe

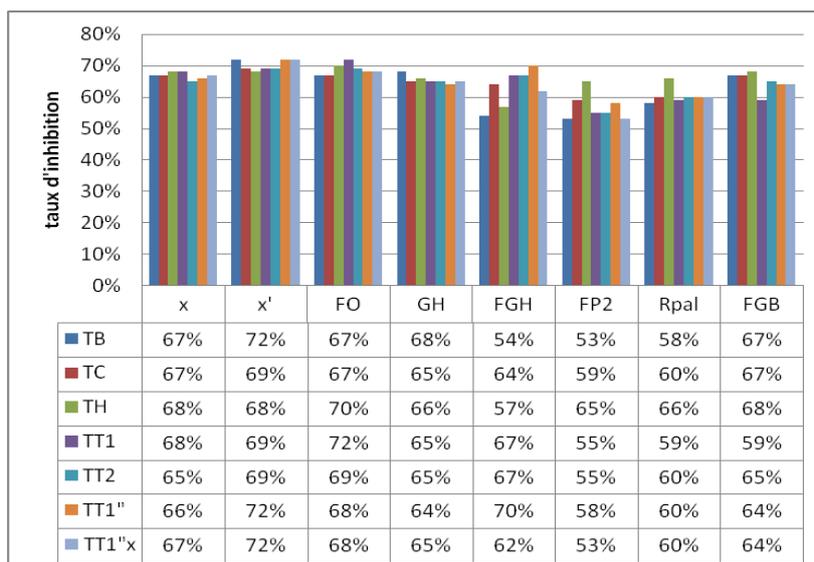
Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante en comparaison à ceux obtenus avec les différentes confrontations (Pathogène – Antagoniste).

Après 4 jours d'incubation, les sept isolats sélectionnés ont montré une bonne activité inhibitrice vis à vis les souches pathogènes test (huit souches de *Fusarium*) et ce, par l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour l'ensemble des souches pathogènes. La figure 16 montre quelques exemples de l'inhibition de croissance de *Fusarium* par trois différents isolats.



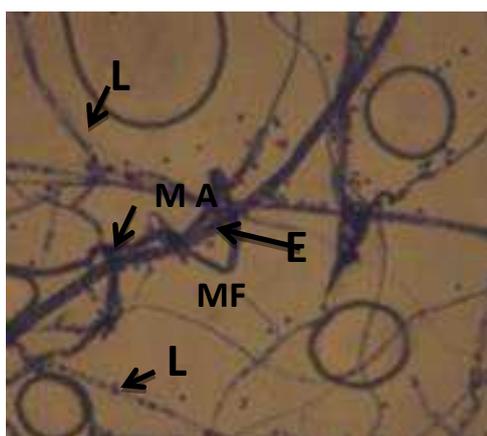
**Figure 16** Inhibition du développement de *Fusarium* par trois différents isolats antagonistes.

Les résultats montrent qu'au bout de quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, alors que les isolats de *Fusarium* n'occupent qu'une surface variant de 20 à 28 mm de diamètre, ce qui correspond à une inhibition de croissance mycélienne supérieure à 65 %. Le témoin des souches de *Fusarium* cultivé seul, occupe une surface variant de 55 à 60 mm de diamètre (annexe 3). En effet, le calcul du taux d'inhibition montre que toutes les souches de *Fusarium* sont inhibées à plus de 55% quel que soit l'antagoniste utilisé. La souche X' (*Fusarium verticillioides*) s'avère la plus sensible avec un taux d'inhibition de 72% pour TB; TT1" et TT"x, 69% pour TC; TT1 et TT2 et 68% pour TH (figure 17).



**Figure 17** Estimation des pourcentages d’inhibition des souches pathogènes par les souches antagonistes isolées.

D’un autre coté, les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les antagonistes et le *Fusarium*, montrent un enroulement du mycélium d’antagoniste sur celui du *Fusarium* (figure 18).



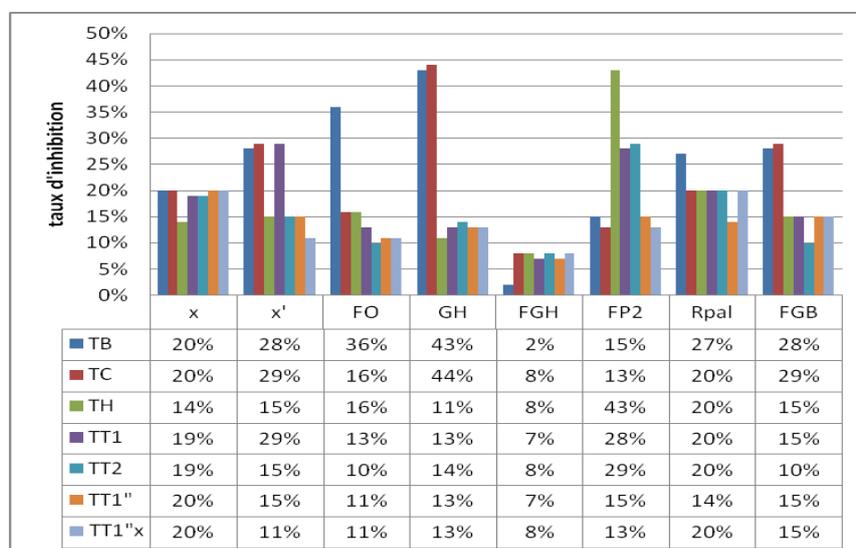
**Figure 18** Observation microscopique de la zone de contact entre le pathogène et l’antagoniste. MA. Mycélium de l’antagoniste, MF. Mycélium de *Fusarium*, E. Enroulement, L. lyse de Mycélium

#### 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* exercé par les souches antagonistes comparativement aux témoins. Il ressort de ce résultats, que malgré l’absence d’un contact direct entre les isolats de *Fusarium*

et les antagonistes testés, ces derniers ont pus exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies de *Fusarium*. Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de *Fusarium* cultivé en présence et en l'absence de l'antagoniste (annexe 3).

Contrairement au test de confrontation directe, on remarque que la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps (annexe 3). Après 5 jours d'incubation, la souche FGH (*Fusarium solani*) semble être la moins sensible aux substances produites par les sept souches antagonistes avec un taux d'inhibition de 2% avec TB et 8% avec TC et TH. Pendant la même période, la croissance mycélienne de la souche GH (*Fusarium oxysporum*) est sensiblement plus inhibée avec un taux d'inhibition de 43% avec TB et 44% avec TC, la souche FP2 (*Fusarium solani*) montre une sensibilité considérable de 43% avec TH. D'une manière générale, l'effet des substances volatiles émises par les sept espèces antagonistes est sensiblement faible. TC se montre toutefois plus efficace avec des taux d'inhibition les plus élevés (43% et 44%) (figure 19).



**Figure 19** : Estimation des pourcentages d'inhibition des souches pathogènes par les souches antagonistes.

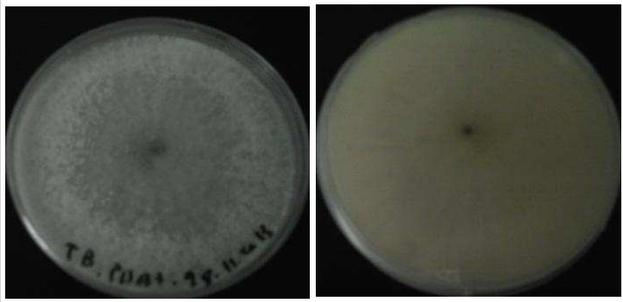
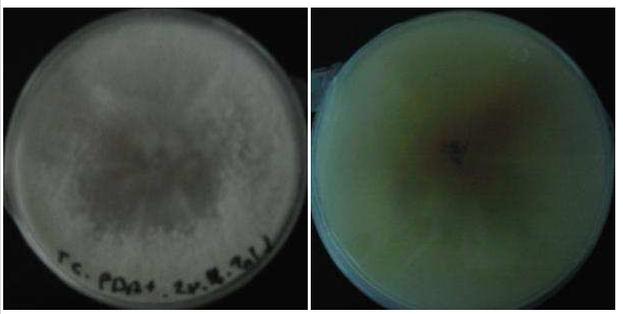
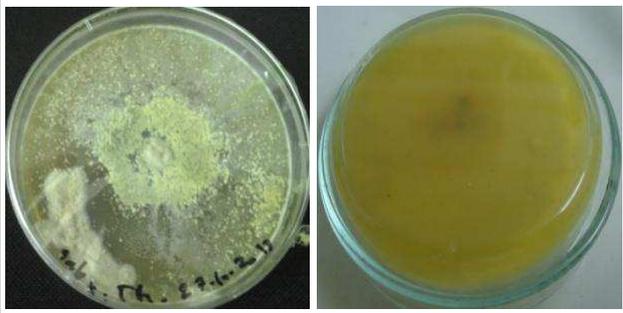
#### 4.2.3.3- Identification des isolats sélectionnés

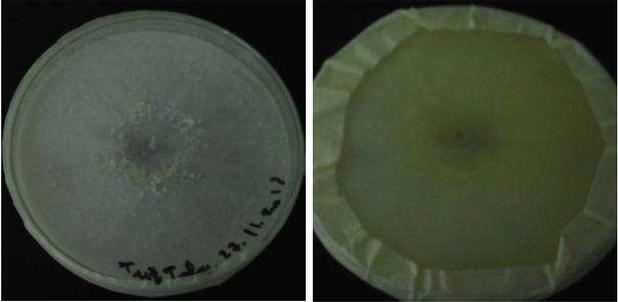
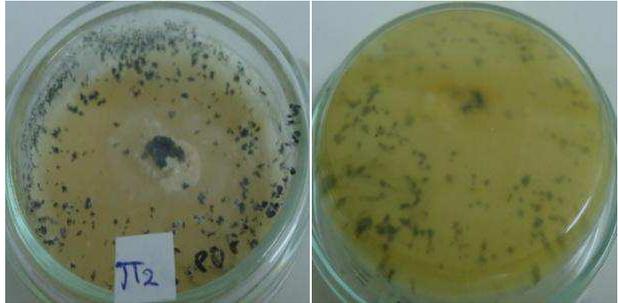
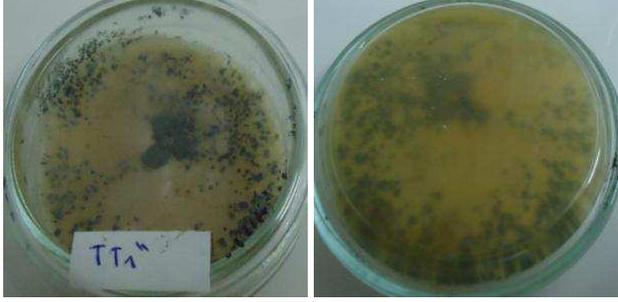
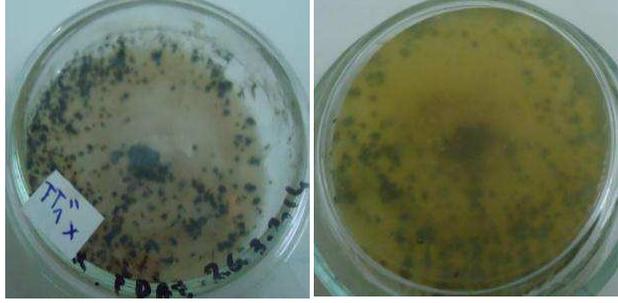
L'identification des moisissures sélectionnées a été faite, en première lieu, par une analyse des critères macroscopiques et microscopiques.

**\* Critères d'identification macroscopique**

Les caractères macroscopiques des différents isolats sélectionnés ont été étudiés sur le milieu PDA. Le tableau 6 récapitule l'aspect des colonies purifiées: surface et consistance des colonies, couleur du revers de la colonie ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

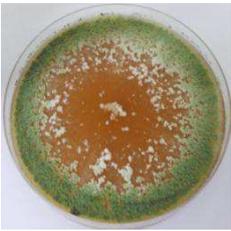
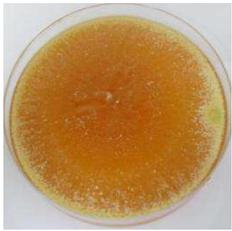
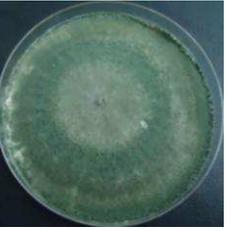
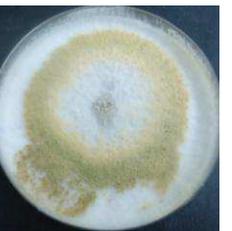
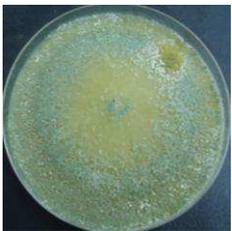
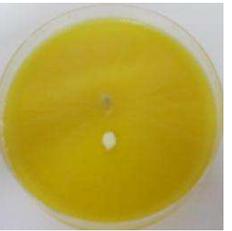
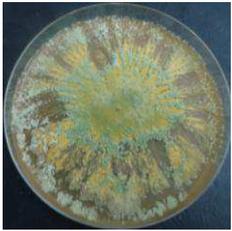
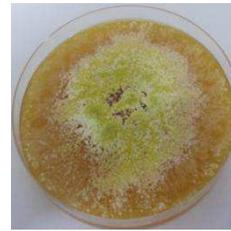
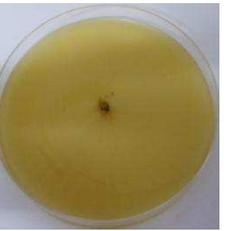
**Tableau 6** Observation macroscopique des souches antagonistes.

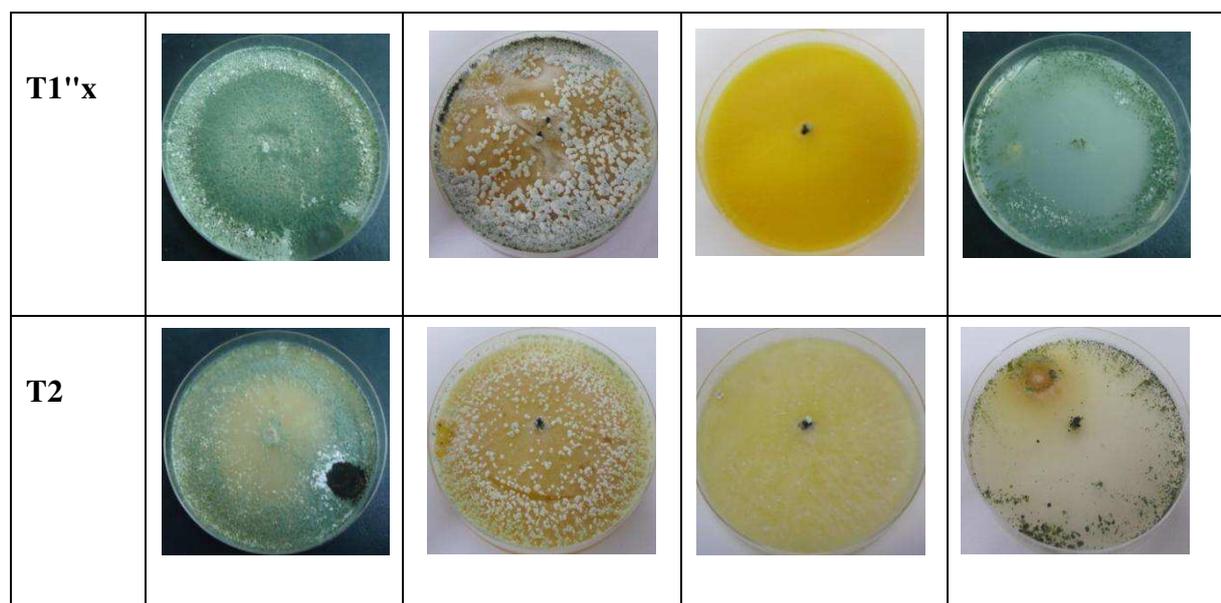
Sol	Codes isolats	Observation macroscopique sur milieu PDA Après 6 jour de culture	Caractères macroscopiques
Sol agricole Gardaya	TB		- colonie blanchâtre, puis verdâtre. - le revers est incolore .
Sol agricole Collo	TC		- colonie blanche puis verdâtre . -le revers est incolore
Sol agricole Constantine	TH		- colonie poudreuse verdâtre puis jaunâtre . -revers jaune.

<p><b>Sol Agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT1</b></p>		<p>- colonie verdâtre. - revers incolore.</p>
<p><b>Sol Agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT2</b></p>		<p>- colonie verdâtre. - revers incolore</p>
<p><b>Sol Agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT1''</b></p>		<p>- colonie verdâtre. - revers incolore.</p>
<p><b>Sol Agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT1'' X</b></p>		<p>- colonie verdâtre.. -revers incolore</p>

Un repiquage sur trois milieu Saboureaud, MEA et Czapeck dox (annexe 1) de cultures a été fait pour toutes les souches pour comparer le changement de leurs aspects ( tableau 7).

**Tableau 7** Observation macroscopique des souches antagonistes sur différent milieux de cultures.

Milieux	PDA	MEA	Saboureaud	Czapeck dox
Isolats				
<b>TC</b>				
<b>TB</b>				
<b>TH</b>				
<b>T1</b>				
<b>T1''</b>				

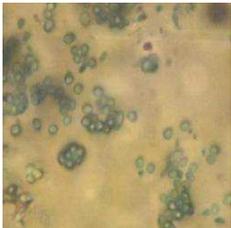
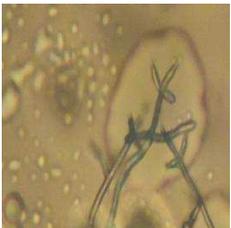
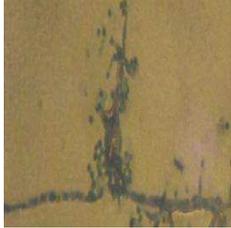


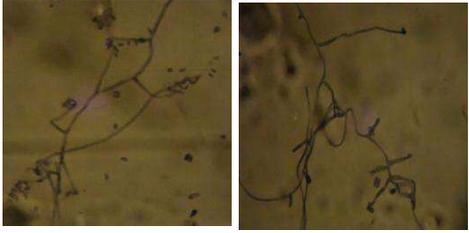
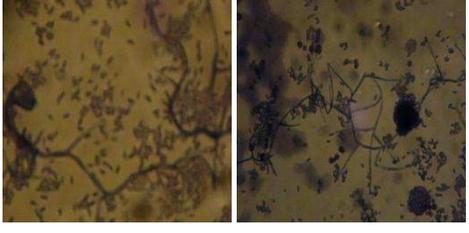
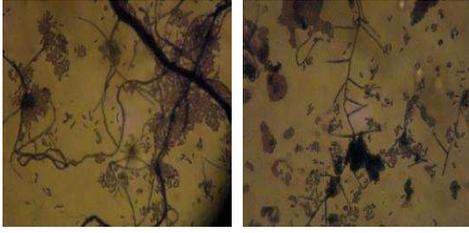
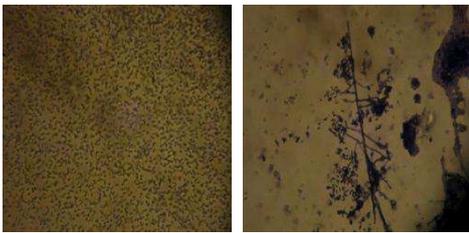
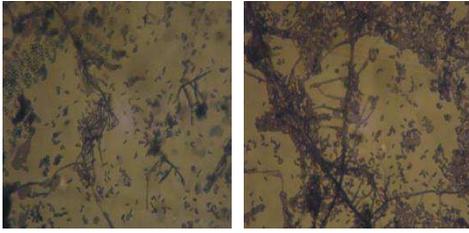
Le résultats du repiquage sur différents milieu de culture (PDA, MEA, Saboureaud, Czapeck dox) montre que les souches antagonistes se développent bien sur les deux milieux PDA et MEA, alors que leurs développement sur les deux derniers milieux est moins dense.

**\* Critères d'identification microscopique**

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 7 souches fongiques sélectionnées. le tableau 8 résume les différents caractères microscopiques observés.

**Tableau 8** Interprétation des observations microscopiques des isolats antagonistes.

Sol	Codes isolats	Observation microscopique	Caractères microscopiques
<b>Sol agricole Gardaya</b>	<b>TB</b>	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé,</li> <li>- conidiophores ramifiés.</li> <li>-phialides ampulliformes</li> <li>- conidies globuleuses lisses.</li> </ul>
<b>Sol agricole Collo</b>	<b>TC</b>	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>-filament septé,</li> <li>- conidiophores ramifiés.</li> <li>-phialides ampulliformes</li> <li>- conidies globuleuses lisses.</li> </ul>

<p><b>Sol agricole Constantine</b></p>	<p><b>Th</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé,</li> <li>- conidiophores peu ramifiés.</li> <li>- conidies ovoïdes ou elliptique lisses.</li> </ul>
<p><b>Sol agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT1</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>- conidiophores long et peu ramifiés.</li> <li>- conidies ovoïdes ou elliptique lisses.</li> </ul>
<p><b>Sol agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT2</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>- conidiophores long et peu ramifiés.</li> <li>- conidies ovoïdes lisses.</li> </ul>
<p><b>Sol agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT1''</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>- conidiophores long et peu ramifiés.</li> <li>- conidies ovoïdes ou elliptique lisses..</li> </ul>
<p><b>Sol agricole Tolgua</b></p>	<p><b>TT1''x</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- filament septé.</li> <li>- conidiophores long et peu ramifiés.</li> <li>- conidies ovoïdes ou elliptique lisses.</li> </ul>

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 tout les isolats antagonistes appartiennent au genre *Trichoderma*. Afin de confirmer cette constatation et d'en déduire les espèces de chaque isolat, une identification approfondie, par voie moléculaire, a été effectué.

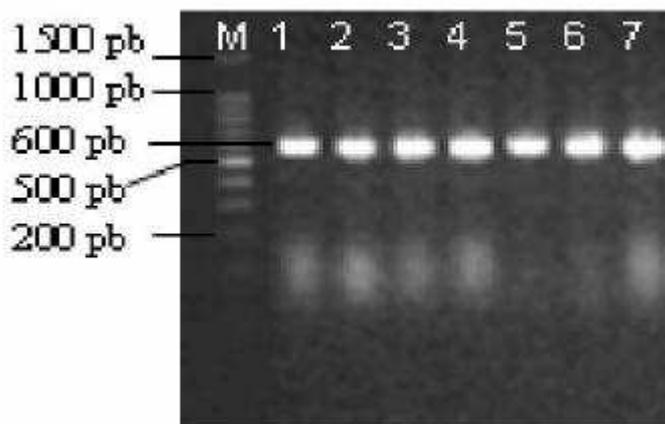
**\* Identification moléculaire**

Les caractères morphologiques, étudiés ci-dessus, n'étaient pas suffisants pour distinguer les espèces de *Trichoderma* en raison des ressemblances morphologiques des colonies et des fructifications.

Les données moléculaires dérivant de l'ADN et des enzymes étaient très utiles pour une caractérisation objective de *Trichoderma* comparativement aux méthodes classiques.

Les caractères morphologiques, étudiés ci-dessus, n'étaient pas suffisants pour distinguer les espèces de *Trichoderma* en raison des ressemblances morphologiques des colonies et des fructifications.

Les données moléculaires dérivant l'ADN sont très utiles pour une caractérisation objective de *Trichoderma* comparativement aux méthodes classiques. Pour ce faire, un séquençage du gène 18S rDNA a été effectué. L'amplification de l'ADN par PCR a montré, sur gel d'électrophorèse, que les bandes d'ADN obtenues correspondent à ceux de 600 pb et ce, pour toutes les souches de *Trichoderma* (figure 20). Ces souches ont été identifiées, définitivement, grâce à l'analyse des séquences ITS (ITS1 et ITS4) (tableau 9)



**Figure 20** Séparation sur gel d'agarose (1.5%) des produits d'amplification par PCR de l'ADN des isolats de *Trichoderma*. M: marqueur de poids moléculaire 100 pb, pistes 1-7 (isolats antagonistes, 1 : TC, 2: TB, 3: TH, 4: TT1, 5: TT2, 6: TT1", 7: TT1"x).

**Tableau 9** Affiliation phylogénique des isolats antagonistes.

N°	Désignation	Blast ncbi	Numéro d'accession	% identité
1	TC	<i>Trichoderma album</i>	JF304318	100
2	TB	<i>Trichoderma harzianum</i>	JX518920.1	100
3	Th	<i>Trichoderma virens</i>	KF691803.1	99
4	TT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF908787.1	100
5	TT2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF908787.1	98
6	TT1''	<i>Trichoderma viride</i>	KF723610.1	99
7	TT1''x	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF908787.1	99

D'après les résultats d'affiliation, les sept souches antagonistes appartiennent aux 5 espèces de *Trichoderma*, à savoir: *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*.

Cette étude a, en effet, montré une diversité importante des espèces de *Trichoderma* en Algérie.

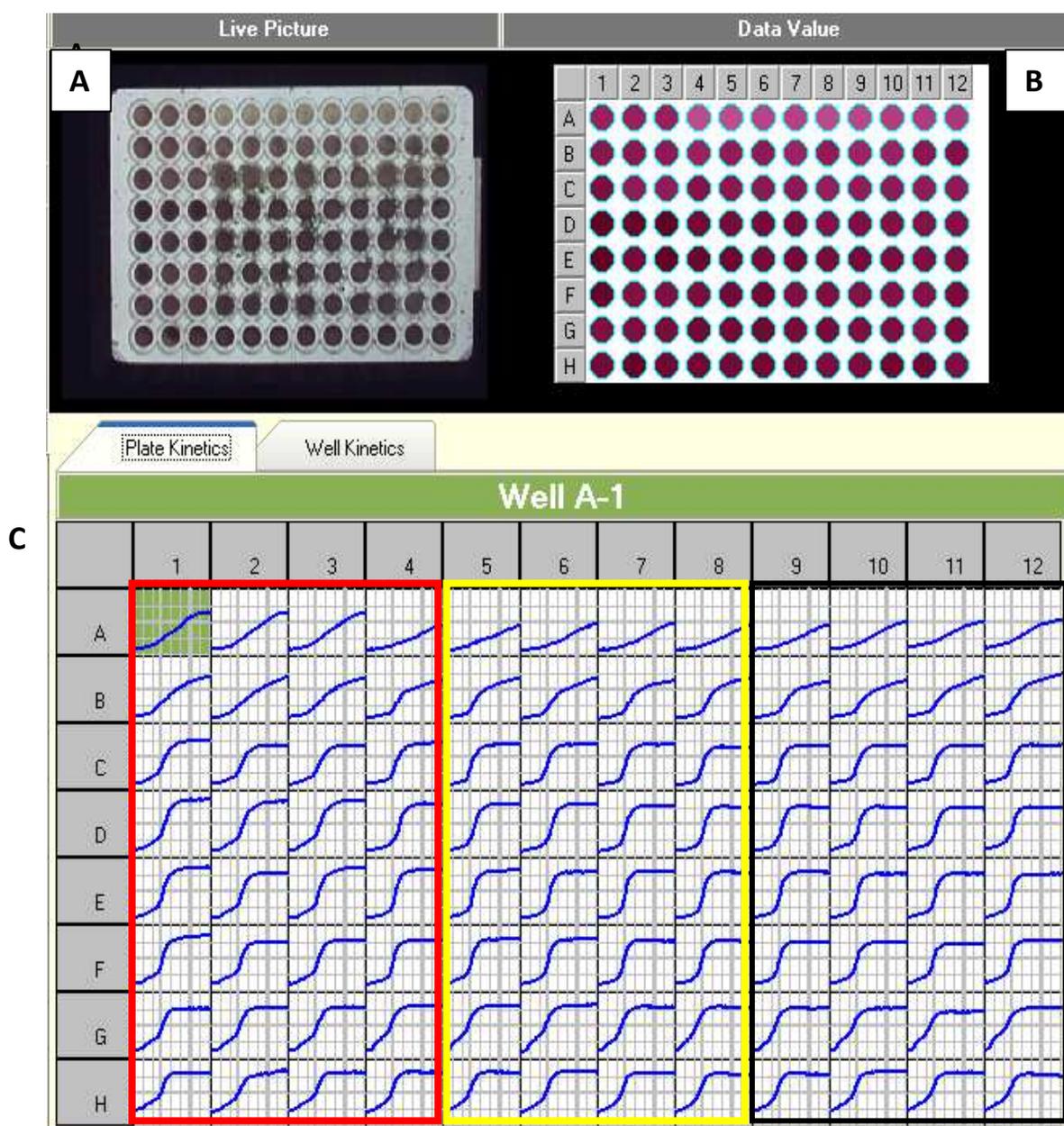
### **4.3. Effet du pH sur le développement des souches antagonistes**

L'effet du pH sur les différentes souches antagonistes a été étudié selon deux méthodes, la première par le test BIOLOG, sur milieu de culture liquide en utilisant des microplaques, la deuxième, sur milieu de culture solide.

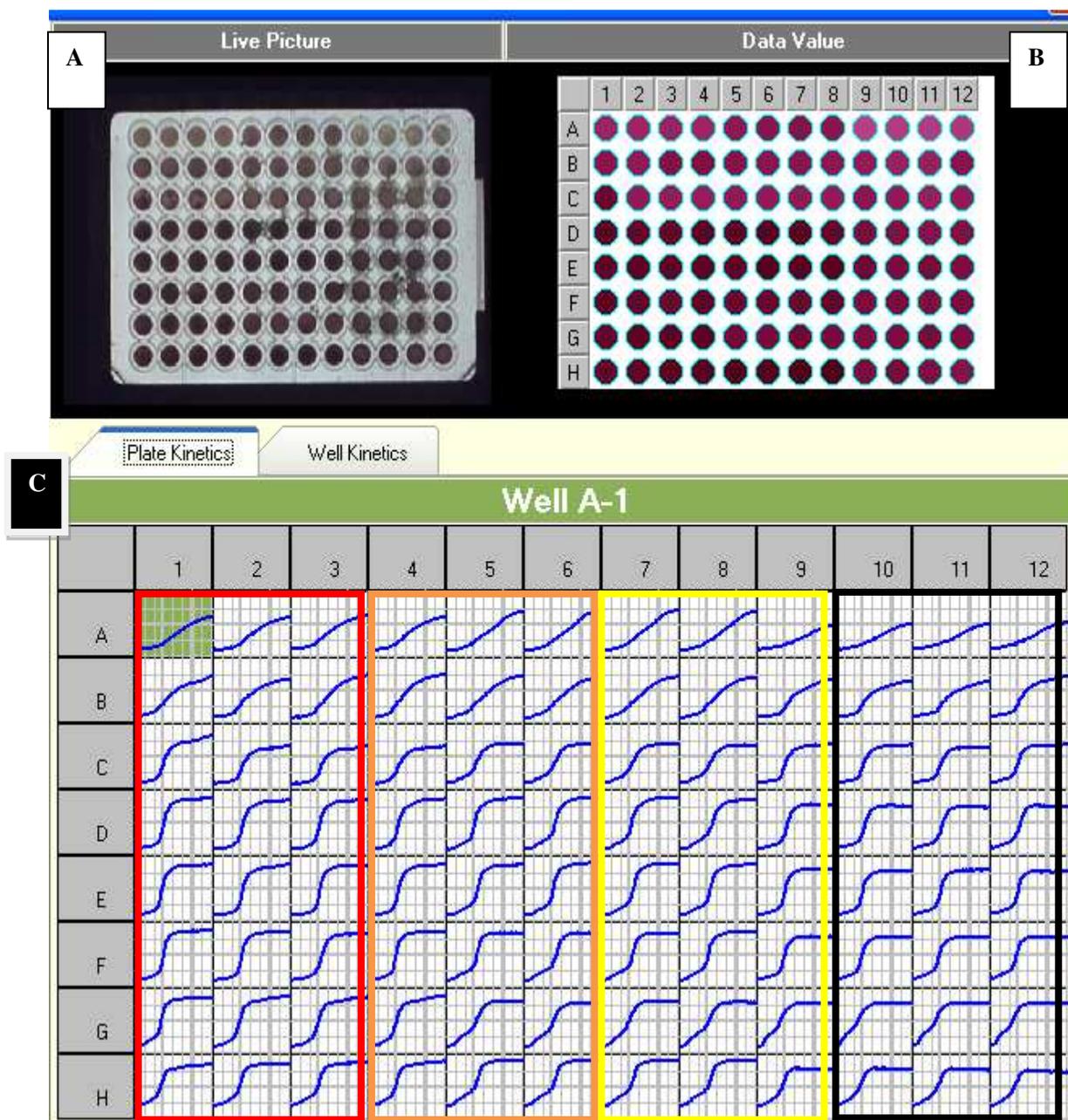
#### **4.3.1. Effet du pH sur milieu liquide (Technique du microplaque- BIOLOG)**

Le milieu utilisé pour cet objectif est le milieu Sabouraud liquide, préparé à différents pH allant de 2 jusqu'à 9 avec un incrément de 1. Le suivi de la réaction a été réalisé à l'aide du système Omnilog de l'appareil Biolog, couplé à un ordinateur.

Le système Omnilog interprète les résultats sous trois formes: une photo réelle de la plaque, une schématisation de la photo réelle et une cinétique de développement de chaque souche dans chaque puits. Les résultats obtenus pour les souches TC (*Trichoderma album*) , TB (*Trichoderma harzianum*) et TH (*Trichoderma virens*) sont représentés dans la figure 22, tandis que ceux des souches T1 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1"(*Trichoderma viride*), T1"x (*Trichoderma longibrachiatum*) et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*) sont montrés dans la figure 23.



**Figure 21** Effet du pH sur les différentes les souches de *Trichoderma* (Tc, TB et Th). **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG; **B:** schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques, la zone rouge: représente l'effet du pH sur la souche Tc (4 répétition), la zone jaune: l'effet du pH sur la souche TB, la zone noire: l'effet du pH sur la souche Th, de A à H les différentes valeurs de pH variant de 2 jusqu'à 9 respectivement.



**Figure 22** Effet du pH sur les différentes souches de *Trichoderma* (T1, T1'', T1''x et T2). A: photo réelle de la plaque BIOLOG, B: Schématisation de la plaque BIOLOG, C: cinétique de développement des cellules fongiques, la zone rouge représente l'effet du pH sur la souche T1 (3 répétition), la zone orange, l'effet du pH sur la souche T1'', la zone jaune, l'effet du pH sur la souche T1''x, la zone noire l'effet du pH sur la souche T2. de A à H les différentes valeurs de pH de variant de 2 à 9

Les résultats représentés dans les figures 21 et 22, montrent que toutes les souches peuvent se développer à différentes valeurs de pH, allant de 2 jusqu'à 9. En effet, les figures 21.A et 22.A, montrent un développement remarquable au niveau des puits de la microplaque, traduit par une croissance de l'agent antagoniste sur le milieu de culture utilisé (du clair vers le foncé), de plus, le changement de couleur observé dans les figures 21.B et 22.A, est expliqué par la réaction chimique du Dye (chimie redox) avec les cellules vivantes provoquant une coloration rose foncé des cultures.

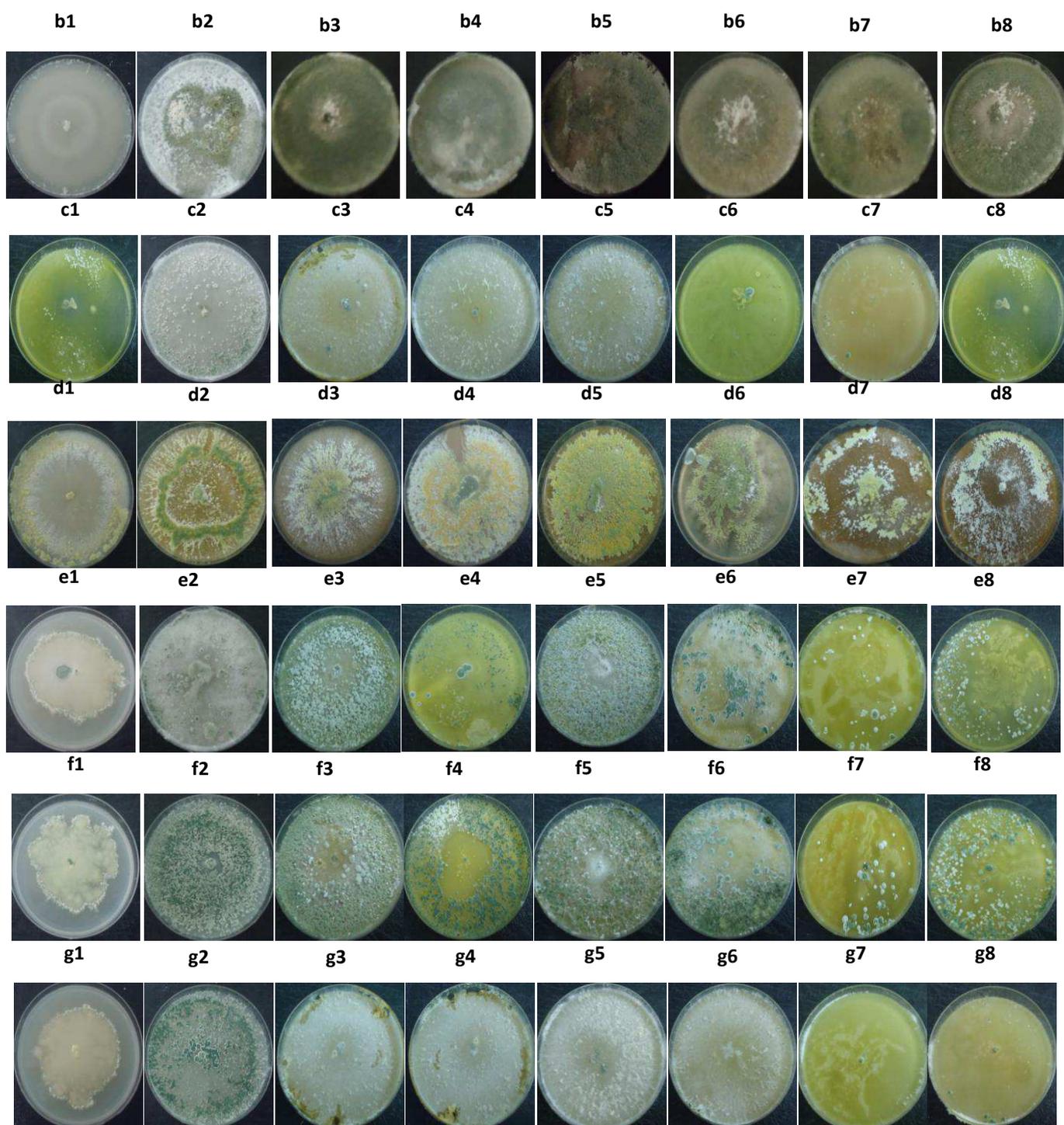
Les cinétiques de croissance établie par le biologue démontrent, également, que les sept souches supportent beaucoup plus les pH basiques, mais elles peuvent aussi se développer sur des milieux à pH acides (2 et 3) même avec une faible croissance.

#### **4.3.2. Test de pH sur boîte**

Le milieu utilisé pour cet objectif est le milieu PDA, préparé à différents pH allant de 2 jusqu'à 9 avec un incrément de 1.

Chaque souche antagoniste, a étéensemencée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu indiqué. Les résultats obtenus après 6 jours d'incubation à 28°C sont présentés dans la figure ci-dessous.

Les résultats du test de pH obtenus, sur boîte, confirment le test de BIOLOG. Les souches, selon leur aspect (figure 23), se développent bien sur les milieux à pH basique et neutre, alors que la plupart donnent un aspect pâle sur les milieux acides.

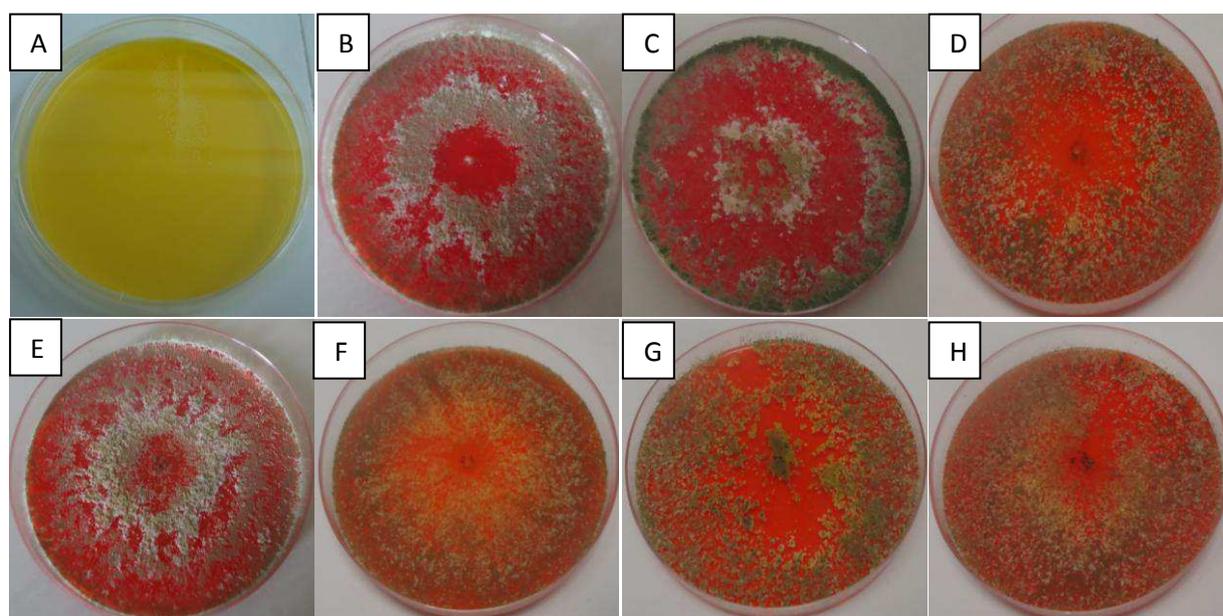


**Figure 23** Effet du pH sur le développement des différentes espèces de *Trichoderma*. Les chiffres de 1 à 8 signifient les différents pH de 2 à 9. Les lettres : a; TC, b; TB, c; Th, d; T1, e; T1'', f; T1''x, g; T2 signifient les différentes espèces de *Trichoderma*.

#### 4.4. Test de l'activité enzymatique des souches antagonistes

##### 4.4.1- Activité chitinase

L'activité chitinolytique des souches antagonistes est testée sur un milieu de culture à base de chitine colloïdale, contenant un indicateur de pH (rouge Phénol). La dégradation de la chitine par les souches testées, et donc la production de l'enzyme chitinase, se traduit par un changement de couleur du jaune (milieu acide) vers le rouge (milieu basique) (figure 24).

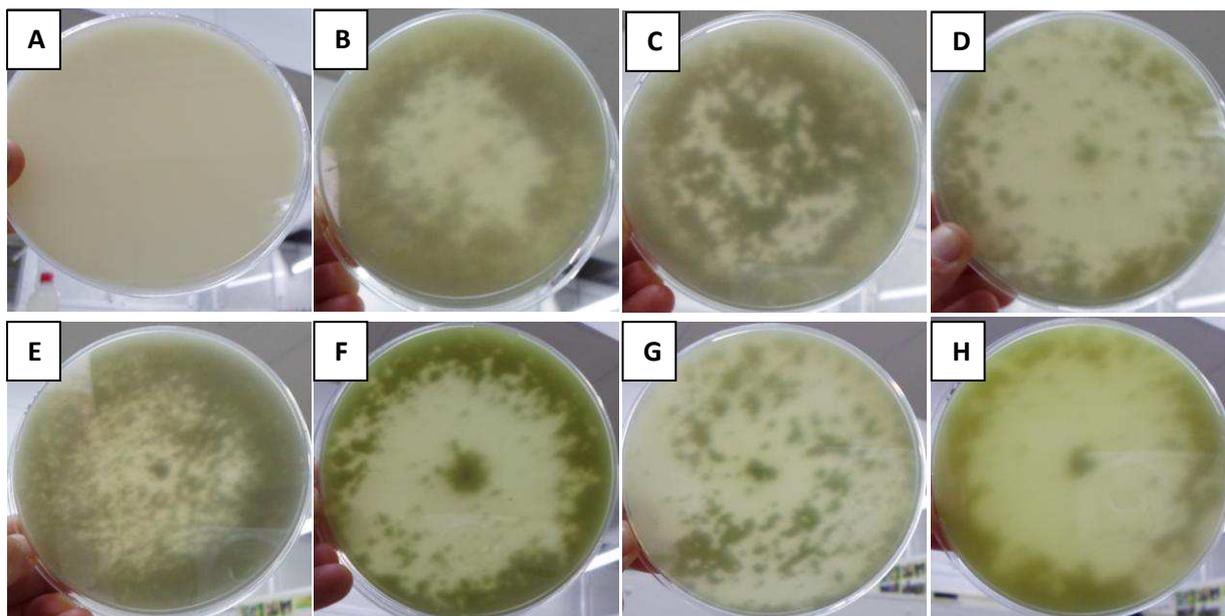


**Figure 24** Test de l'activité chitinase des souches de *Trichoderma*. **A**: un milieu de culture témoin. **B, C, D, E, F, G, H** représentent **TC** (*Trichoderma album*) , **TB** (*Trichoderma harzianum*) et **TH** (*Trichoderma virens*) **T1** (*Trichoderma longibrachiatum*), **T1''**(*Trichoderma viride*), **T1''x** (*Trichoderma longibrachiatum*) et **T2** (*Trichoderma longibrachiatum*) successivement.

Les résultats obtenus montrent un changement total de la couleur des milieux vers le rouge sang, ce qui signifie la dégradation de la chitine dans le milieu. Ce résultat indique que toutes les espèces de *Trichoderma* testées, sont capables de produire l'enzyme chitinase.

##### 4.4.2- Activité protéase

L'activité protéolytique des souches antagonistes a été testée sur un milieu à base de lait. La production de l'enzyme protéase, se traduit par l'apparition de zones transparentes sur le milieu de culture.

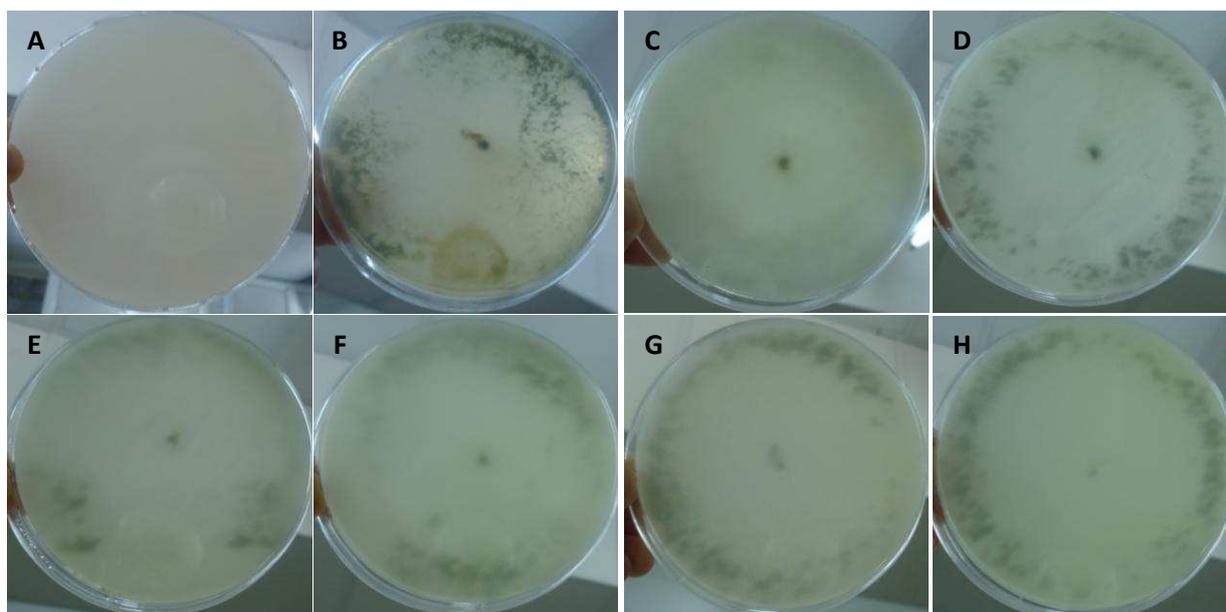


**Figure 25** Test de l'activité protéase des souches de *Trichoderma*. **A**: un milieu de culture témoin. **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H** représentent **TC** (*Trichoderma album*) , **TB** (*Trichoderma harzianum*) et **TH** (*Trichoderma virens*) **T1** (*Trichoderma longibrachiatum*), **T1'**(*Trichoderma viride*), **T1''**x (*Trichoderma longibrachiatum*) et **T2** (*Trichoderma longibrachiatum*) successivement

Les résultats de l'activité protéasique montrent une transparence du milieu de culture ensemencé par les souches antagonistes testées, par rapport au témoin qui présente un aspect blanc opaque. Ce résultat confirme la production de l'enzyme protéase par les espèces de *Trichoderma* testées.

### 3.4.3- Activité cellulase

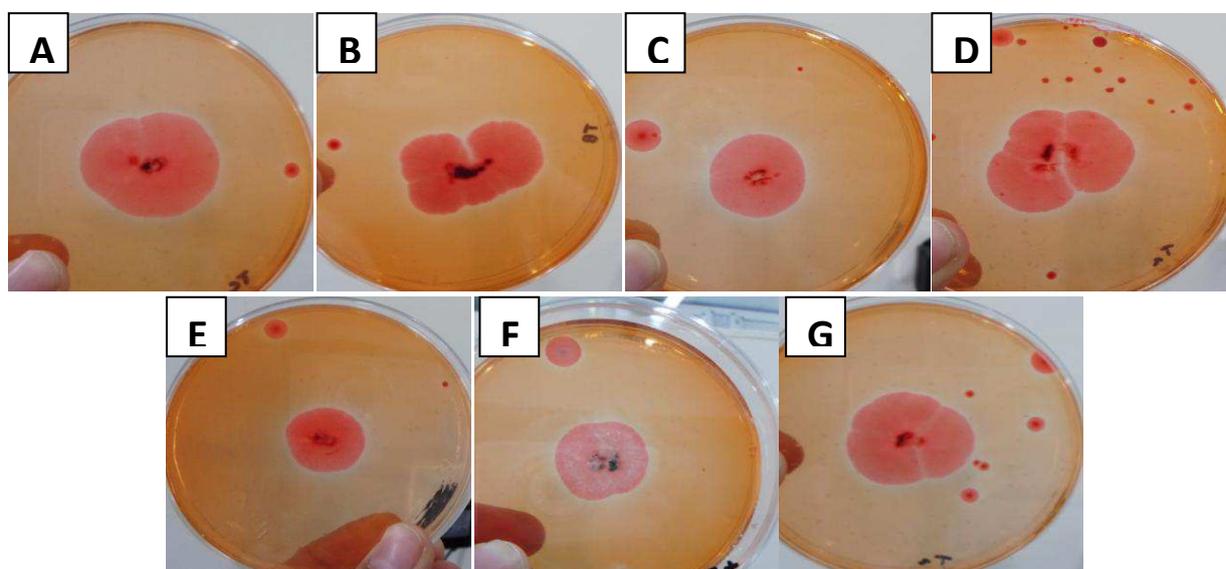
La technique la plus évidente pour mettre en évidence l'activité cellulase, est de montrer la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (en poudre à 0.5%) comme seule source carbonée. La production de l'enzyme cellulase se traduit par l'apparition de zones transparentes sur le milieu de culture (figure 26). Les résultats montrent une bonne activité cellulolique induite par les sept souches de *Trichoderma*.



**Figure 26** Test de l'activité cellulase des souches de *Trichoderma*. **A**: un milieu de culture témoin ; **B, C, D, E, F, G, H** représentent TC (*Trichoderma album*), TB (*Trichoderma harzianum*), TH (*Trichoderma virens*), T1 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1' (*Trichoderma viride*), T1'x (*Trichoderma longibrachiatum*) et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*) successivement.

### 3.4.4- activité lipase

Le test de l'activité lipolytique des souches antagonistes, effectué sur un milieu à base d'huile (Tributyryne), a montré que les souches antagonistes en question, sont capables de produire l'enzyme lipase. Cette production se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie fongique (figure 27).



**Figure 27** Test de l'activité lipase des souches de *Trichoderma*. **A, B, C, D, E, F, G**, représentent TC (*Trichoderma album*), TB (*Trichoderma harzianum*), TH (*Trichoderma virens*), T1 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1' (*Trichoderma viride*), T1'x (*Trichoderma longibrachiatum*) et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*) successivement

## 4.5. Production et extraction des molécules bioactives élaborées par les antagonistes sélectionnés

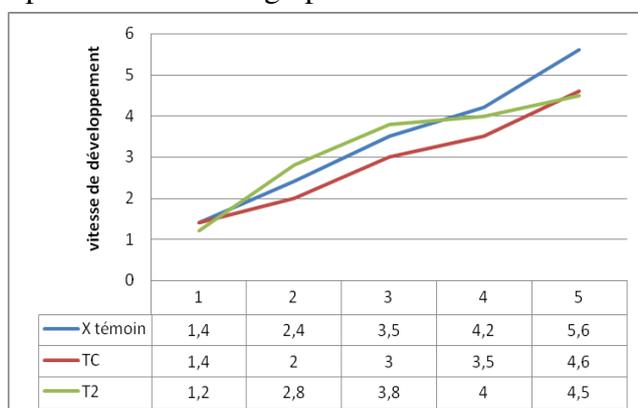
Cette partie a pour objectif de produire les différents métabolites secondaires bioactifs des souches antagonistes sélectionnées.

### 4.5.1- Production de métabolites secondaires par fermentation

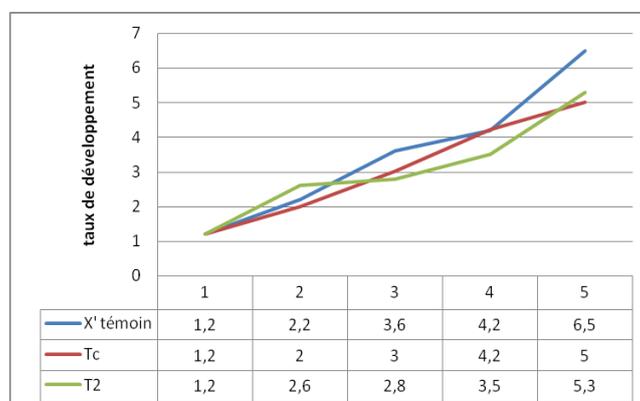
Après 15 jours de fermentation des souches antagonistes sélectionnées, cinq fioles de chaque souche ont servis pour faire des tests d'antagonismes, *in vitro*, vis-à-vis des souches de *Fusarium*, tandis que les cinq cultures restantes ont été utilisées pour effectuer l'extraction des métabolites secondaires.

### 4.5.2- Mise en évidence de l'activité antifongique des surnageants de culture

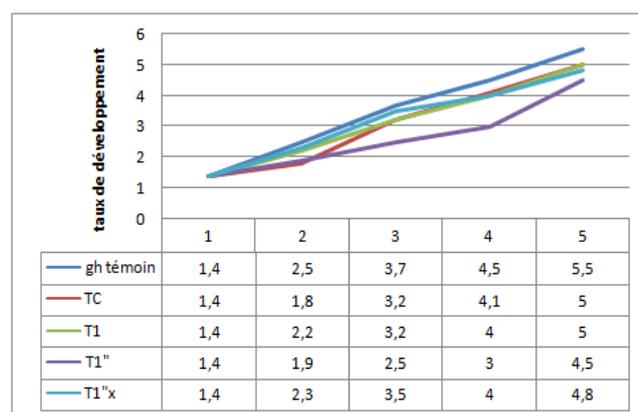
Le surnageant de culture obtenu après filtration du produit de fermentation, a été utilisé pour des tests d'antagonisme vis-à-vis les souches de *Fusarium*. Les résultats obtenus sont présentés dans les graphes ci-dessous.



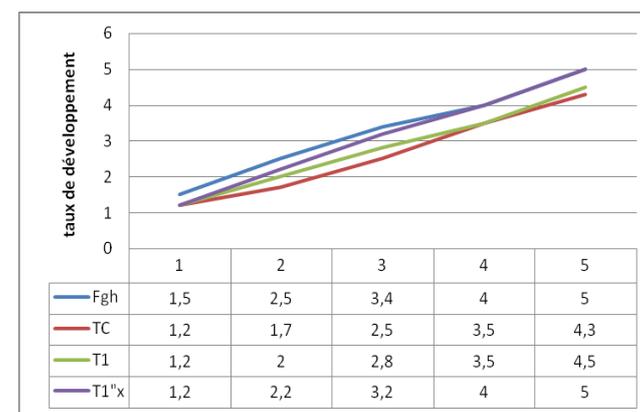
**Figure 28** Cinétique de développement de *Fusarium verticilloides* (X) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T2).



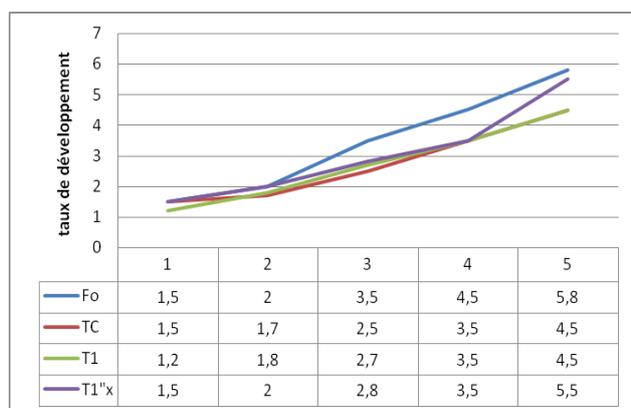
**Figure 29** Cinétique de développement de *Fusarium verticilloides* (X') cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T2).



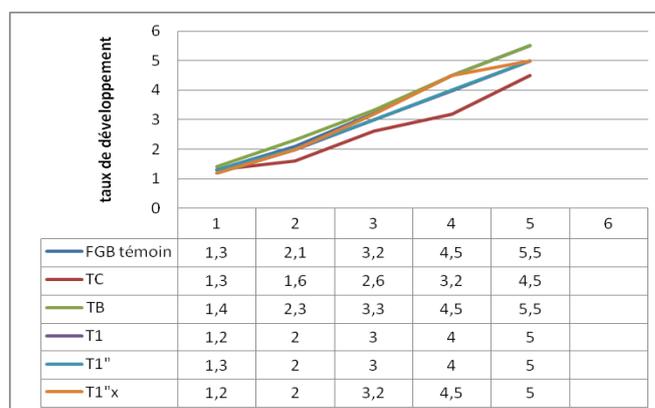
**Figure 30** Cinétique de développement de *Fusarium oxysporum* (Gh) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T1 et T1"x) et *Trichoderma viride* (T1")



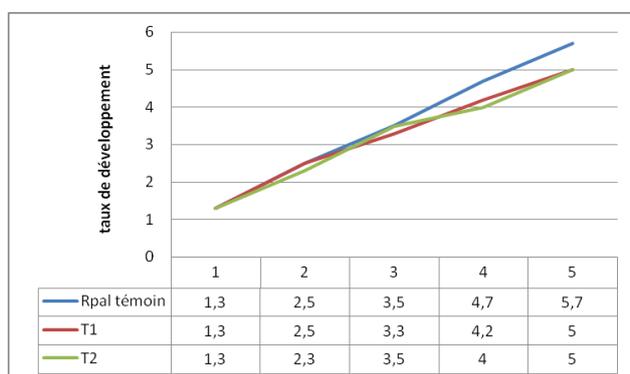
**Figure 31** Cinétique de développement de *Fusarium solani* (FGh) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T1) et *Trichoderma viride* (T1")



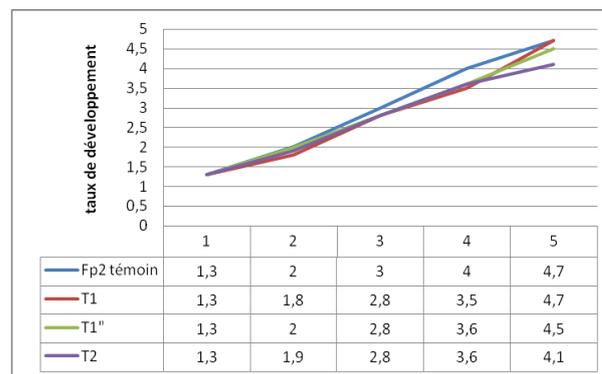
**Figure 32** Cinétique de développement de *Fusarium solani* (FO) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T1 et T1''x)



**Figure 3** Cinétique de développement de *Fusarium oxysporum* (FGB) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma album* (TC), *Trichoderma harzianum* (TB) *Trichoderma longibrachiatum* (T1 et T1''x) et *Trichoderma viride* (T1'')



**Figure 34** Cinétique de développement de *Fusarium oxysporum* (Rpal) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma longibrachiatum* (T1 et T2)

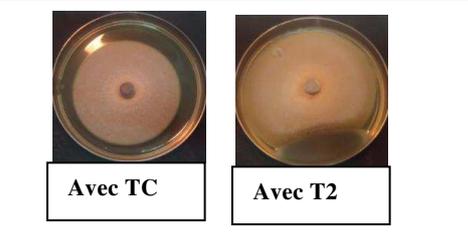
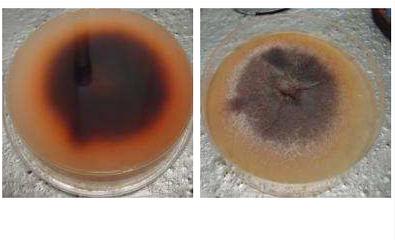
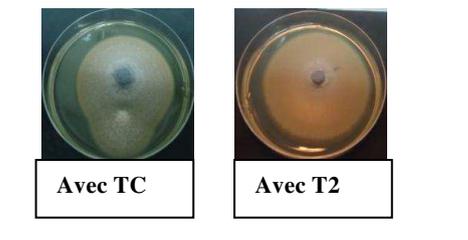
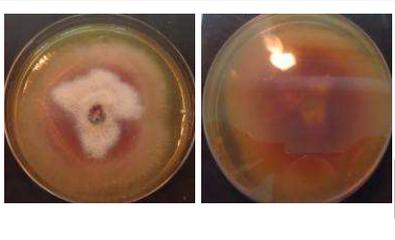
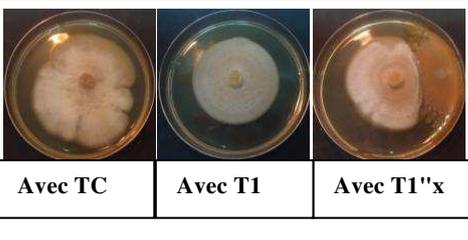
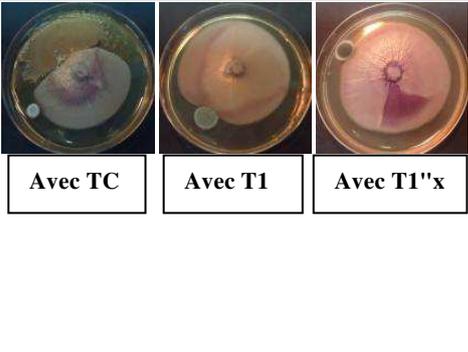
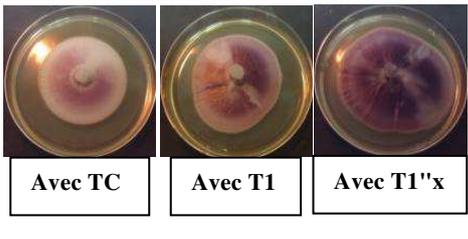


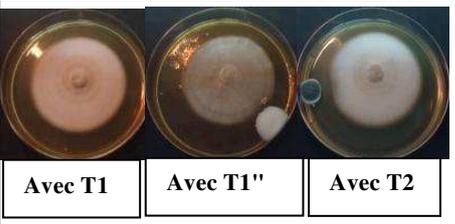
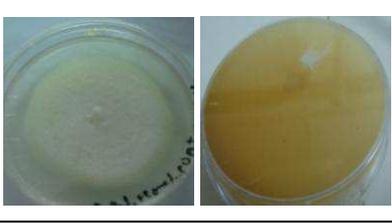
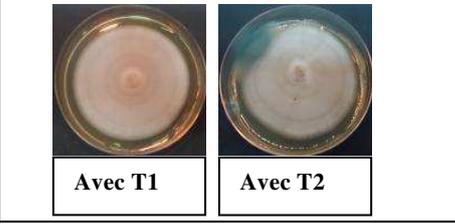
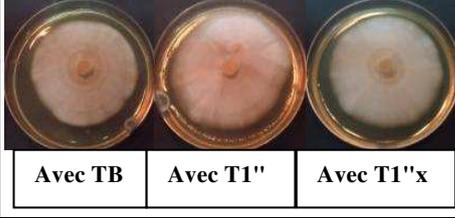
**Figure 35** Cinétique de développement de *Fusarium solani* (Fp2) cultivé en présence des surnageants de culture de *Trichoderma longibrachiatum* (T1 et 2) et *Trichoderma viride* (T1'')

Une faible inhibition de la croissance mycélienne a été induite par les souches de *Trichoderma* contre tous les pathogènes. Les souches pathogènes X et X', appartenant à *Fusarium verticiloides*, montrent une sensibilité considérable avec les antagonistes *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T2), alors que toutes les souches pathogènes restantes, jugées moins sensibles, montrent un taux de développement près du normal, par rapport au témoin. .

Par ailleurs, cette étude a montré un changement remarquable de la couleur et de l'aspect des souches de *Fusarium* et ce, par tout les surnageants de culture testés (tableau 10).

**Tableau 10** Aspects macroscopiques des souches pathogènes cultivées en présence des surnageants de culture des antagonistes

Codes isolats	Aspect des souches de <i>Fusarium</i> cultivées seules (témoins)	Aspect des souches de <i>Fusarium</i> cultivées en présence des surnageants de culture des antagonistes	Changements des caractères macroscopiques observés par rapport au témoin
F1 X		 Avec TC      Avec T2	- colonie aplatie blanche, - décoloration de la colonie avec TC et T2
X' F2		 Avec TC      Avec T2	- colonie aplatie blanche, - décoloration de la colonie avec TC et T2
FO F3		 Avec TC      Avec T1      Avec T1"x	-colonie aplatie blanche, -décoloration de la colonie avec TC, T1 et T1"x
GH F4		 Avec TC      Avec T1      Avec T1"x	- colonie aplatie avec disparition de l'aspect filamenteux. - changement de couleur de la colonie, vers le rose pâle avec TC, vers le rose avec T1 et T1"x.
FGH F5		 Avec TC      Avec T1      Avec T1"x	-colonie aplatie, avec disparition de l'aspect filamenteux. - changement de couleur de la colonie, vers le rose foncé.

<p><b>FP2</b> <b>F6</b></p>		 <p>Avec T1    Avec T1''    Avec T2</p>	<p>-ralentissement du développement</p>
<p><b>Rpal</b> <b>F7</b></p>		 <p>Avec T1    Avec T2</p>	<p>- colonie aplatie, blanche.</p>
<p><b>FGB</b> <b>F8</b></p>		 <p>Avec TB    Avec T1''    Avec T1''x</p>	<p>- colonie laineuse - décoloration du mycélium fongique.</p>

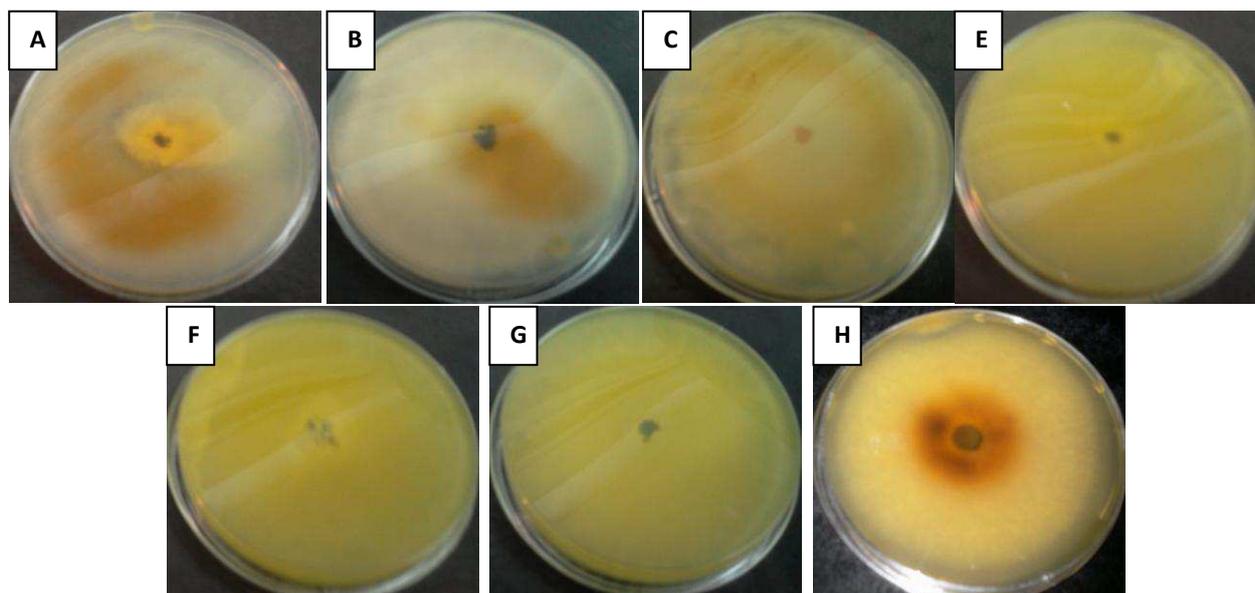
TC (*Trichoderma album*), TB (*Trichoderma harzianum*), TH (*Trichoderma virens*), T1, T1''x et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1''(*Trichoderma viride*).

X et X ''(*Fusarium verticillioides*), Fo, FGH, Fp2 (*Fusarium solani*) GH, Rpal, FGB(*Fusarium oxysporum*).

Les observations faites par rapport au changement de couleur (décoloration) de l'agent pathogène, cultivé avec le surnageant de culture de l'agent antagoniste, mettre en évidence l'hypothèse que ces souches antagonistes peuvent produire l'enzyme laccase, responsable de la décoloration du mycélium fongique.

- **Test de laccase**

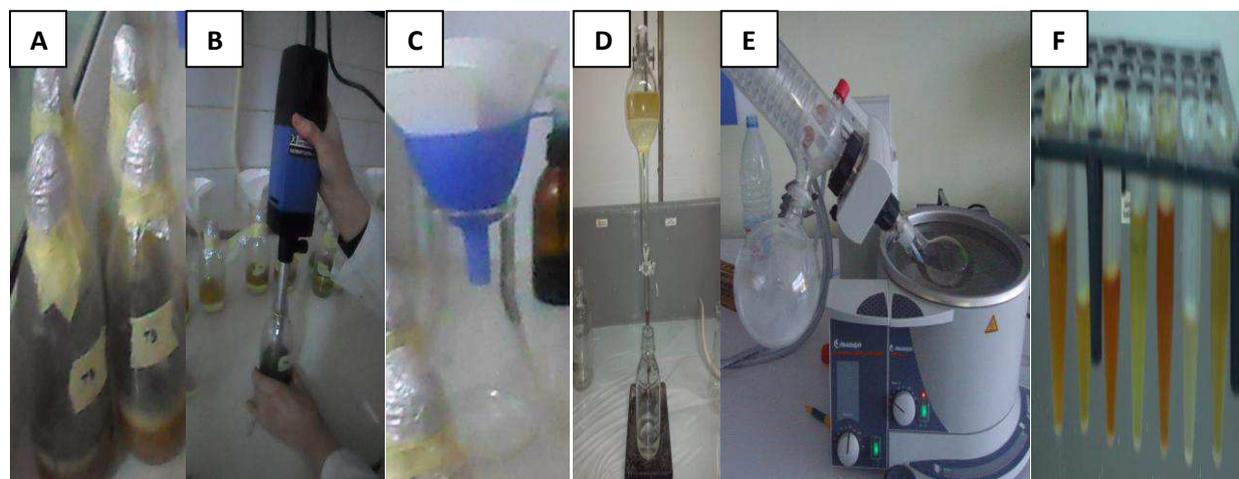
Le test de laccase effectué sur les souches antagonistes a montré une bonne activité laccase induite par les souches de *Trichoderma*. En effet, *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma longibrachiatum* (T2), présentent la plus forte activité laccase, traduite par un halo remarquable de couleur orange très foncé (figure 37).



**Figure 36** Test de l'activité laccase des souches de *Trichoderma*. A, B, C, D, E, F, G, représentent TC (*Trichoderma album*), TB (*Trichoderma harzianum*), TH (*Trichoderma virens*), T1 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1"(*Trichoderma viride*), T1"x (*Trichoderma longibrachiatum*) et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*) respectivement.

#### 4.5.3- Extraction des molécules bioactives

Les souches de *Trichoderma* ont été sélectionnées pour leur activité antifongique importante contre un large spectre de champignons phytopathogènes. Après fermentation de 15 jours sur milieu PDB, le contenu de chaque erlen a subi une extraction par du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), puis une filtration et une décantation. La phase chloroformique contenant les biomolécules est évaporée à sec. Enfin, le résidu est recueilli de nouveau à l'aide du DMSO (figure 37).



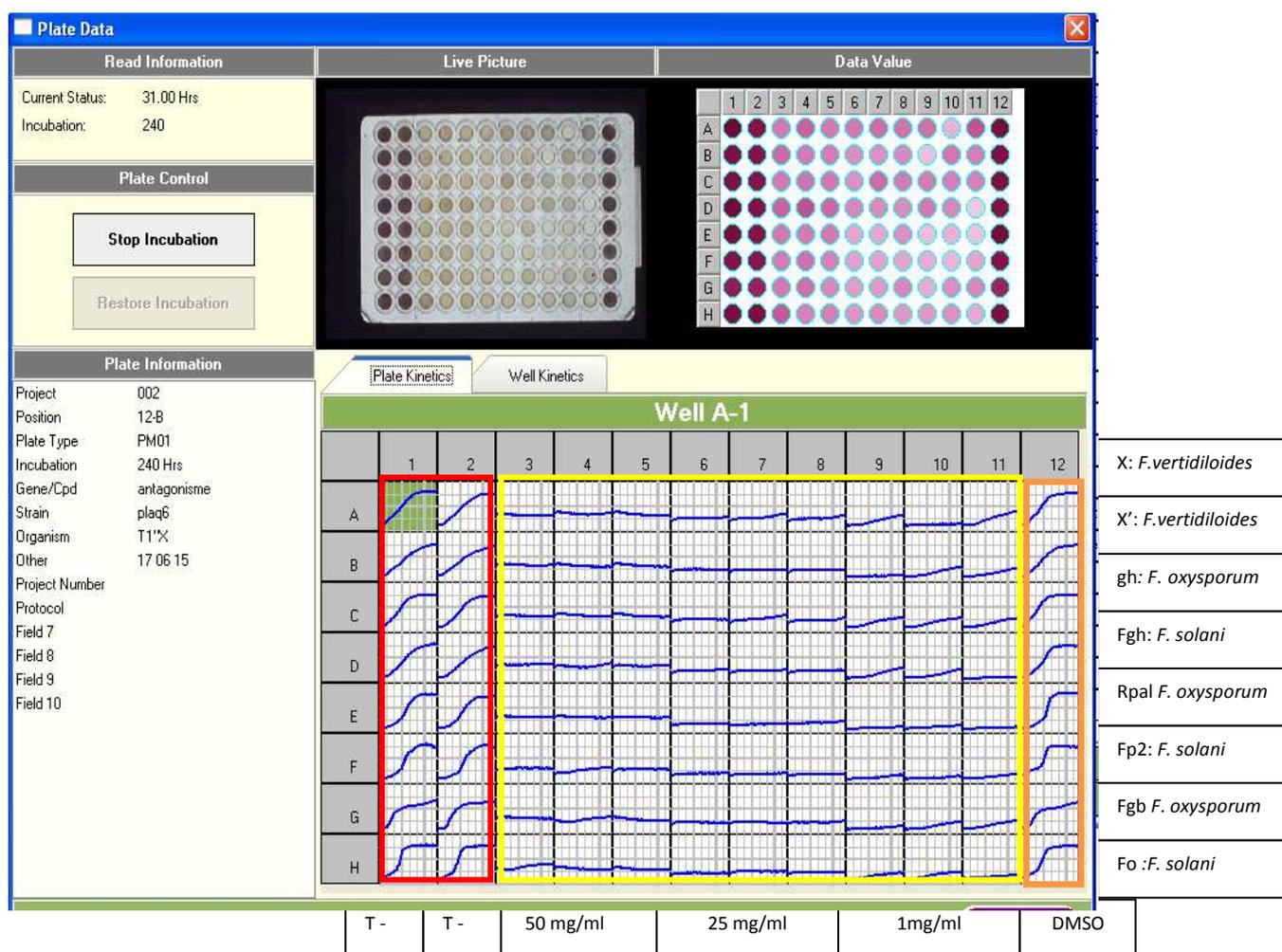
**Figure 37** Etapes de l'extraction des métabolites des souches de *Trichoderma* A : milieu après fermentation, B : extraction par le chloroforme et l'ultraturax, C : filtration D : décantation, E : évaporation, F : extraits des sept souches de *Trichoderma* solubilisés dans le DMSO.

### 4.5.3.1- Test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques des souches antagonistes

#### \* Test par BIOLOG

La mise en évidence de l'activité antifongique des extraits chloroformiques a été effectuée à partir d'une solution mère de concentration de 50 mg.ml<sup>-1</sup> (50mg d'extrait dans 1ml du solvant DMSO), et ce par la technique BIOLOG (voir partie matériel et méthode).

Le suivie de la réaction, réalisé à l'aide du système Omnilog, a abouti aux résultats présentés ci-dessous.



**Figure38** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma album* (TC) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

Le résultat représenté dans la figure 37 montre que l'extrait chloroformique de *Trichoderma album* (TC), avec les différentes concentrations utilisées (50 mg /ml, 25mg/ml et 1mg/ml), a pu inhiber le développement de toutes les cellules fongiques pathogènes testées. En effet, la figure 37.A montre que toutes les souches de *Fusarium* ne présentent aucun développement après leur ensemencement avec les extraits chloroformiques de *Trichoderma album* (TC), contrairement aux témoins (deux premières rangés) et au contrôle positif (DMSO) (dernière rangé) qui présentent un bon développement dans les puits. De plus, la couleur rose claire, des puits, observée dans la figure 37.B, est expliquée par l'absence de la réaction chimique du Dye (chimie redox), puisque il n'ya pas de cellules vivantes à l'intérieur de ces puits, contrairement, aux deux premières rangés qui sont colorées par du violet (réaction entre le Dye et les cellules vivantes), idem pour la dernière rangé (contrôle positif).

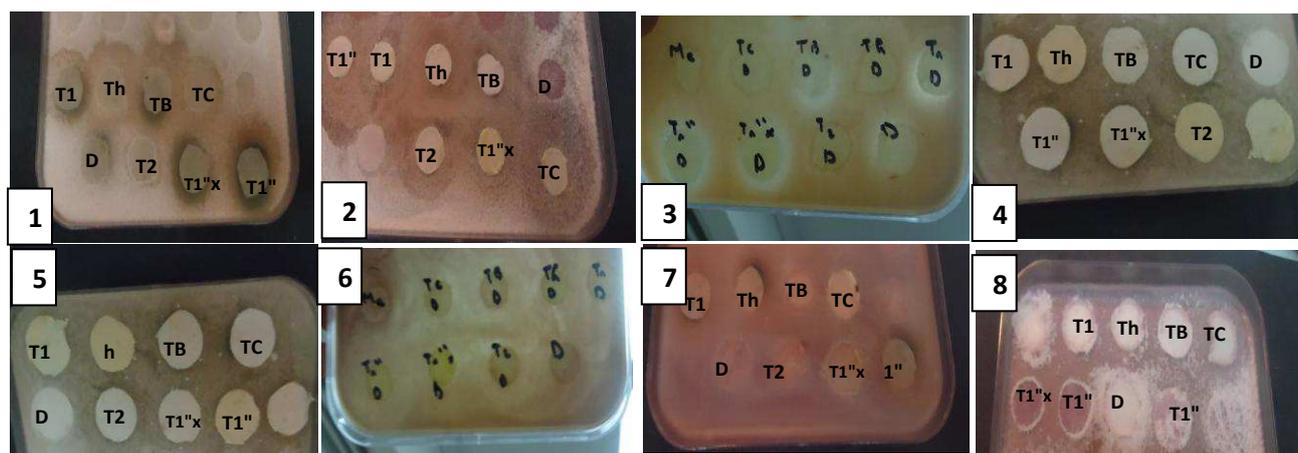
La zone jaune de la figure 38 A, montre que les cinétiques de croissance des souches pathogènes sont nulles en comparaison à celles représentées dans la zone rouge (considérée comme témoin non traités). Par ailleurs, le test antifongique effectué par le DMSO a montré que ce dernier n'a pas un effet inhibiteur sur la croissance du pathogène (zone orange).

Les mêmes constatations ont été faites par rapport aux autres souches antagonistes en l'occurrence : TB (*Trichoderma harzianum*), TH (*Trichoderma virens*), T1 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1"(*Trichoderma viride*), T1"x (*Trichoderma longibrachiatum*) et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*) (annexe 3).

#### **\* Test par la technique des disques imbibés**

Le test d'antagonisme effectué par les disques imbibés avec l'extrait chloroformique a pour objectif de confirmer les tests de BIOLOG.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de toutes les souches antagonistes sélectionnées présentent une activité antifongique remarquable et ce, contre toutes les souches de *Fusarium* pathogènes testées (figure 39). En effet, cette figure montre l'absence de développement de l'agent pathogène après incubation de 6 jours autour des disques imbibés par les extraits chloroformiques solubilisés dans le DMSO, des souches antagonistes testées. Ce résultat confirme celui obtenu par le test BIOLOG, qui conclut que les souches antagonistes en question, ont une capacité de production de molécules bioactives.



**Figure 39** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma* sur les souches pathogènes (technique des disques imbibés). TC (*Trichoderma album*), TB (*Trichoderma harzianum*), TH (*Trichoderma virens*), T1, T1''x et T2 (*Trichoderma longibrachiatum*), T1''(*Trichoderma viride*). les chiffres de 1 à 8: X (*Fusarium verticillioides*), X ''(*Fusarium verticillioides*), Fo(*Fusarium solani*), FGH(*Fusarium solani*), Fp2 (*Fusarium solani*) GH(*Fusarium oxysporum* ), Rpal (*Fusarium oxysporum* ), FGB (*Fusarium oxysporum* ) successivement D: DMSO

## 5. Discussion

La fusariose est un terme générique qui désigne un groupe de maladies cryptogamiques, causées par une grande diversité de champignons du genre *Fusarium*. La maladie des plantes concernées révèle une gravité variable selon les espèces. Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (Hibar *et al.*, 2004). En dépit des pertes économiques qu'ils entraînent, le contrôle de ces pathogènes reste toujours limité à des mesures prophylactiques. La désinfection du sol n'est jamais complète en raison d'une part, de la difficulté de sa réalisation (Benhamou *et al.*, 1997) et d'autre part, à l'induction de souches résistantes ajoutée aux fortes potentialités de conservation du pathogène dans le sol. De plus, l'inefficacité des méthodes de lutte chimique ainsi que l'absence de génotypes végétaux, réellement résistants, imposent la considération d'autres méthodes alternatives de lutte contre ce champignon, entre autres par la lutte biologique, qui se basent sur l'exploitation des potentialités microbiennes antagonistes.

L'isolement de l'agent pathogène « *Fusarium* » a été réalisée à partir de différents organes et grains de plantes infectés, prélevés à partir de différentes régions en l'occurrence: Hamma Bouziane (Constantine), Tolgua (Biskra), Setif, Ben madhi (Gardaya), El-khroub (Constantine).

Les cultures réalisées à partir des différents échantillons à savoir: grains de maïs, grains de blé, gains des haricots, feuilles et racines des palmiers, et tiges des oliviers, ont aboutit à divers aspects, textures et couleurs de colonies.

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. La maladie du Bayoud provoquée par *Fusarium oxysporum*, constitue la principale maladie qui affecte le palmier dattier (Dihazi, 2012). Son expansion a été responsable de la perte de plus des deux tiers d'arbres du palmier dattier. En 1994, Boulila et Mahjoub ont montré l'existence de 4 champignons parasites en l'occurrence: *Armillariella mellea* (Vahl) Kumm., *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi., *Fusarium solani* (Mart.) Sacco et *Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butler, associés au dépérissement de .+jeunes oliviers issus de boutures herbacées. Les deux derniers champignons ont été

fréquemment isolés et notés comme agents infectant les oliviers, que ce soit séparément ou ensemble.

Sur la base des caractéristiques du *Fusarium* que nous recherchons, huit isolats ont été sélectionnés et purifiés. Les isolats obtenus ont été identifiés selon les méthodes d'identifications classiques macroscopiques et microscopiques. En effet, cette étude a montré que les colonies présentent deux aspects différents à savoir, colonie aplatie et laineuse. Les couleurs, aussi, étaient différentes variant entre le blanc, le rouge, l'orange, le violet et le jaune. 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.

Cependant, l'étude microscopique effectuée sur les isolats obtenus, a montré que certains d'entre eux possèdent, des macroconidies fusiformes pluriseptées (3 à 7 septums), peut ou pas courbées et des chlamydospores terminales ou intercalaires. Tandis que les autres possèdent des microconidies ovoïdes pluriseptées et sont dépourvus de chlamydospores, Néanmoins, tous les isolats disposent d'un filament septé.

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).

Actuellement, les principales techniques d'identification de *Fusarium* sont basées sur la visualisation de ces caractères phénotypiques sur milieu de culture (Le Blou'ch *et al.*, 2000). Ces techniques sont longues, coûteuses, nécessitent un personnel spécialisé et sont peu reproductibles. En se plaçant au niveau du génome, les techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction), permettent d'échapper aux variations phénotypiques dues aux variations des conditions de culture et aux dégénérescences. En effet, l'expression des gènes est variable selon le milieu de culture et une culture peut avoir des éléments de détermination peu fiables notamment en cas de polycontamination. Le génome, quant à lui, subit très peu de variation.

Dans ce travail, les ADN des isolats pathogènes, codants pour les ARN ribosomiaux 18s, ont été d'abord extraits, puis amplifiés par la technique de la PCR. Les produits PCR obtenus ont été séquencés et comparés, par la suite, avec les séquences des microorganismes enregistrés au niveau de la base de données Genbank. L'analyse des séquences d'ARNr 18s des souches

fongiques a permis d'affilier les huit souches pathogènes et d'arriver a une identification définitive. En effet, les souches isolées appartiennent à 3 espèces de *Fusarium* en l'occurrence; *Fusarium verticillioides* (**X et X'**), *Fusarium solani* (**Fo, FGH et Fp2**) et *Fusarium oxysporum* (**Rpal, FGB et GH**).

Les souches X et X', appartenant toutes les deux à *Fusarium verticillioides*, ont été isolées à partir des grains de maïs, la souche Fo (*Fusarium solani*) a été isolée à partir des tiges d'olivier, les souches FGH(*Fusarium solani*) et GH (*Fusarium oxysporum*) ont été isolées à partir des grains du haricot, les souches Fp2 (*Fusarium solani*) et Rpal (*Fusarium oxysporum*) ont été isolées à partir des feuilles et des racines des palmier dattier, enfin, la souche FGB (*Fusarium oxysporum*) a été isolée à partir des grains du blé.

En effet, Les fusarioses du maïs, antérieurement attribuées au seul taxon *F. roseum*, sont en fait, le résultat de contamination par différentes espèces de *Fusarium*, principalement *F. graminearum*, *F. verticiloides* et *F. proliferatum* (O'Donnell *et al.*, 2004). De plus, *Fusarium solani* est retrouvé parmi les champignons parasites associés au dépérissement de jeunes oliviers issus de boutures herbacées (Boulila et Mahjoub, 1994).

Deux principaux types de fusariose sont en mesure de se développer dans les parcelles de blé à la floraison. Ces maladies sont provoquées par *Microdochium nivale* (responsable des mouchetures) et les champignons pathogènes de la famille des *Fusarium* (Flodrops, 2006).

Par ailleurs, la pourriture des racines des haricot est causée par un complexe de champignons pathogènes, vivant dans le sol et appartenant aux espèces *Pythium*, *Fusarium solani* f sp *phaseoli*, *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium rolfsii* (Buruchara, 2003).

Sur un autre volet, la recherche de souches antagonistes efficaces est la base de toute lutte biologique. La technique d'isolement employée dans ce travail, à savoir isolement à partir du sol agricole, a permis d'isoler un nombre relativement élevé de microorganismes. En effet, 80 isolats ont été obtenus, dont 18 sont des bactéries, 8 sont des levures et 54 sont des moisissures. Des études précédentes ont permis d'identifier certains microorganismes impliqués dans les mécanismes de résistance des sols afin de pouvoir sélectionner les plus efficaces et de les utiliser comme agents de lutte biologique (Rouxel *et al.*, 1979).

Dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux champignons endophytes (Moricca et Ragazzi, 2008) qu'on considère maintenant, comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides...(Maheshwari, 2006).

Par ailleurs, la mise en évidence de l'activité antifongique des isolats, effectuée par différentes méthodes de diffusion sur gélose à savoir : la confrontation directe et indirecte, a permis de sélectionner sept moisissures développant des zones d'inhibitions nettes et remarquables vis-à-vis des souches pathogènes test.

Après 4 jours d'incubation, toutes les moisissures antagonistes montre 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. Au-delà de cette période et au terme de six jours, les isolats antagonistes envahis les colonies de *Fusarium* et sporule même sur celles-ci. Cette action est expliqué selon Benhamou, Daami-Remadi, 2001 et Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001, par un pouvoir hautement myco-parasitaire des souches antagonistes.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les agents antagonistes et les souches de *Fusarium*, montrent un enroulement du mycélium des antagonistes sur celui du *Fusarium*, provoquant une lyse. Des résultats similaires ont été obtenus avec *Trichoderma lignorum*, capable de s'enrouler sur le mycélium du *Rhizoctonia solani*, causant ainsi une dissolution du cytoplasme du pathogène (Howell, 2003).

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. Sous microscope, les hyphes sont septés, hyalins, avec des petits conidiophores bien différenciés, portant des phialides en forme de quille. D'après les observations macroscopiques (aspect, couleur, vitesse de croissance des colonies) et microscopiques (nature du filament, présence de conidiophores, forme des conidies), il a été constaté que tout les isolats antagonistes appartiennent au genre *Trichoderma*. 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. Au microscope optique on peut observer 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).

Dans le présent travail, les caractères morphologiques observés, n'étaient pas suffisants pour distinguer les espèces de *Trichoderma* en raison des ressemblances morphologiques des colonies et des fructifications. Pour ce faire, une approche moléculaire a été nécessaire. Les données moléculaires dérivant de l'ADN étaient très utiles pour une caractérisation objective de *Trichoderma* comparativement aux méthodes classiques (Lieckfeldt et Muthumeenakshi, 1998).

L'amplification de l'ADN par PCR a montré, sur gel d'électrophorèse, une seule bande d'environ 600 pb et ce, pour tous les isolats de *Trichoderma*. Les souches de *Trichoderma* isolées ont été identifiées définitivement grâce à l'analyse des séquences ITS (ITS1 et ITS4).

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) (Reiss *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 2004; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Hinrikson *et al.*, 2005 ; Peterson, 2006). Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson *et al.*, 2005).

Si à l'heure actuelle les outils d'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique (Tabuc, 2007)

D'après les résultats d'affiliation, les sept souches antagonistes appartiennent à 5 espèces de *Trichoderma*, en l'occurrence: *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma viride*.

Cette étude a, en effet, montré une diversité importante des espèces de *Trichoderma* en Algérie.

La souche **TC** isolée à partir du sol agricole de Collo présente un pourcentage d'identité de 100% avec *Trichoderma album*. La souche **TB** isolée à partir du sol agricole de Gardaya est similaire à celle de *Trichoderma harzianum* avec un pourcentage de 100%, la souche **Th** isolée à partir du sol agricole de Constantine ressemble à *Trichoderma virens* (99%), la souche **TT1"** isolée à partir du sol agricole de Tolgoua présente un pourcentage d'identité de

99% avec *Trichoderma viride*. Enfin, les souches **TT1, TT2 et TT1''x** isolées, elles aussi, à partir du sol agricole de Tolgua présentent des pourcentages d'identités de 100%, 99% et 99% respectivement avec *Trichoderma longibrachiatum*.

Il est important de signaler, que la littérature ne fournit pas assez d'informations quand à l'isolement de *Trichoderma album*, *Trichoderma virens* et *Trichoderma longibrachiatum* à partir des sols Algériens.

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).

Par ailleurs, 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).

Plusieurs travaux ont élucidé le rôle des souches de *Trichoderma* comme agent antagoniste que se soit vis-à-vis de *Fusarium* ou d'autres phytopathogènes. En effet, Daami-Remadi, (2001) ont montré l'effet inhibiteur de *Fusarium* sur la croissance de *F. solani* var *coeruleum*, *F. roseum* var *sambucinum* et *F. roseum* var *graminearum*, responsables des pourritures sèches sur tubercules de pomme de terre, envers lesquels ils induisent également une lyse importante au niveau du mycélium de ces phytopathogènes. Il en est de même des mycéliums de *Pythium sp.* en présence du même antagoniste (Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001).

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 *Pythiummultimum* 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 à *Fusarium* 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).

Dans ce travail, la confrontation indirecte réalisée entre *Trichoderma* et *Fusarium*, montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de *Fusarium* exercé par les souches antagonistes comparativement aux témoins. Il ressort de ce résultat, que malgré l'absence d'un contact direct entre le *Fusarium* et l'antagoniste testé, ce dernier a pu exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies de *Fusarium*.

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.

Les souches de *Trichoderma*, en question, ont subi un test de pH afin de déterminer l'intervalle de croissances de ces souches. Cette étude a été effectuée sur milieu liquide par le système biolog) et sur milieu gélosé.

Sur le milieu liquide, le suivie de la réaction, réalisé à l'aide du système Omnilog de l'appareil Biolog, a montré un bon développement des souches antagonistes sur le milieu de culture ajusté à différentes valeurs de pH (allant de 2 jusqu'au 9). En effet, le changement de couleur des puits et l'allure des cinétiques de croissance, indiquent que les souches antagonistes, sont capables de se développer dans des milieux acides, alcalins et basiques, notant un meilleur développement à partir d'un pH égal à 4.

Les mêmes observations ont été faites sur milieu de culture solide, ce qui confirme les résultats du test BIOLOG. Les souches, selon leurs aspect, se développent bien sur les milieux à pH basique et neutre, alors que la plus part donnent un aspect pâle sur les milieux acides. Dans leurs travaux, Chet et Baker, (1980) ont indiqué que les niveaux de pH acides augmentent la croissance de *T. harzianum* et stimulent la formation des chlamydo-spores et la germination des conidies.

De leurs côté, Singh *et al.* (2014), ont testé l'effet du pH, *in vitro*, sur le développement de sept souches de *Trichoderma* isolées à partir du sol. Une différence significative dans la production de biomasse a été enregistrée chez ces espèces, à différentes valeurs de pH testées

à savoir, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 et 8,0. Le pH le plus favorable est compris entre 5,5 et 7,5, dans lequel le total du poids sec du mycélium vari entre 1,41 et 1,35 g.

L'activité antifongique, observée par les souches de *Trichoderma*, peut être due à la production d'enzymes extracellulaire, pour ce faire, une série des tests enzymatiques a été effectuée, afin de vérifier cette hypothèse. Il s'agit des tests de production de chitinase, de cellulase, de protéase et de lipase. En effet, toutes les espèces de *Trichoderma* isolées, à savoir : *Trichoderma album* (TC), *Trichoderma harzianum* (TB), *Trichoderma virens* (Th), *Trichoderma viride* (TT1"), et *Trichoderma longibrachiatum* (TT1, TT2 et TT1"x), sont capables de produire l'enzyme chitinase, cellulase, protéase et lipase. 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 cellulytiques.

L'activité mycoparasitaire de *Trichoderma spp.* contre les sclérotés 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.

Sur un autre volet, la production de molécules bioactives à partir des souches de *Trichoderma*, a été effectuée par fermentation sur milieu liquide. La mise en évidence de l'activité antifongique de ces molécules, a été réalisée en testant le filtrat de fermentation dans son état brute et après avoir fait une extraction par du chloroforme.

Le test antifongique, réalisé *in vitro*, par les surnageants de culture des agents antagonistes, ont montré une inhibition de la croissance mycélienne des souches pathogènes. Les souches

pathogènes X et X', appartenant à *Fusarium verticilloides*, montrent une sensibilité considérable par rapport aux antagonistes *Trichoderma album* (TC) et *Trichoderma longibrachiatum* (T2). Une étude faite par Essalmani et Lahlou, (2003), a montré l'action inhibitrice des métabolites sécrétés par *Trichoderma harzianum*, sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, agent phytopathogène des plantes de lentille. Dans une autre étude, il a été constaté que *Trichoderma viride*, *T. virens*, *T. harzianum*, *T. koningii* et *T. pseudokoningii* exercent un effet inhibiteur contre *Alternaria solani* après avoir tester leurs surnageants de culture (Zafar et al., 2013).

Cependant, la mise en évidence de l'activité antifongique des extraits chloroformiques a été effectuée, d'une part, par la technique BIOLOG, et par la technique des disques imbibés d'autre part.

Le résultat du test de BIOLOG montre que les extraits chloroformiques de toutes les espèces de *Trichoderma* isolées, ont pu inhiber le développement de toutes les cellules fongiques pathogènes testées. De plus, il a été remarqué un changement notable de la couleur et de l'aspect des souches de *Fusarium* et ce, par tout les surnageants de culture testés. Ce changement de couleur peut être expliqué par la production de l'enzyme laccase, par les souches de *Trichoderma*, provoquant la décoloration du mycélium fongique du pathogène. Cette hypothèse a été démontrée par un test de production de laccase sur milieu gélosé, en effet, toutes les espèces de *Trichoderma* testées sont capables de produire cette enzyme.

Les mêmes observations ont été faites par la technique des disques imbibés avec l'extrait chloroformique. Ces derniers, présentent une activité antifongique remarquable contre toutes les souches de *Fusarium* pathogènes testées. Cela est traduit par une zone de lyse autour des disques imbibés. Ce résultat confirme celui obtenu par le test BIOLOG, qui conclut que les souches antagonistes en question, ont une capacité de production de molécules bioactives.

Plusieurs études se sont intéressées à la détermination de la nature des métabolites à activité antifongique.

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* isolé 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 volatiles inhibitrices (Calistru et al. 1997). Maladie coton de semis incité 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 volatiles produites par *Trichoderma pseudokoningii*, *T.viride* et *T. aureoviride* affecté 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 volatile 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).

Mukherjee et Raghu (1997) ont étudié l'effet de la température sur la production de métabolites par *Trichoderma sp.* Ils ont observé que *Trichoderma* produit une forte concentration de mycotoxines dans un bouillon de culture à des températures élevées. Cependant, *Trichoderma sp.* n'était pas efficace dans la suppression *S. rolfsii* à une température supérieure à 30 ° C. Mischke *et al.* (1997) ont mesuré l'efficacité des métabolites produits par *Trichoderma sp.* sur la base de l'inhibition de la croissance de *R. solani*. En outre, ils ont observé que les extraits aqueux de jeunes germes cultivés sous lumière de *T. virens* inhibent *R. solani* plus que les extraits de jeunes germes cultivés dans l'obscurité. En outre, ils ont montré que les extraits de *T. virens* cultivées sous faible pH ont montré une activité inhibitrice accrue. En 2001 Landreau a identifié des métabolites polypeptidiques ; des peptaïbols et des ciclosporines à effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoire. Des métabolites non volatils diffusibles : polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères), notamment les trichodermines sont identifiés par Blumenthal, en 2004. Des métabolites volatils, le 6 pentyl \_ pyrone, l' éthylène et le cyanure d'hydrogène, des alcools et des aldéhydes ont été purifiés et identifiés par Vizscaino et son équipe en 2005. Vinale *et al.* (2006) ont isolé des métabolites secondaires à partir de deux souches de *T. harzianum* commercialisés, T22 et T39, pour la première fois. Trois principaux composés bioactifs ont été produites par des souches T22,

dont l'un est un nouveau azaphilone qui a montré une activité antifongique remarquable contre *R. solani*, *P. ultimum* et *G. graminis var. tritici* dans des conditions *in vitro*

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.

Les espèces de *Trichoderma* ont été étudiées comme agents de lutte biologique contre les agents pathogènes fongiques (Howell, 1998; Siddiqui *et al.*, 2001).

*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).

**L'antibiose** est résulte aussi de la production de substances qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène. Cette action est prouvée aussi par les tests de BIOLOG et le test des disques imbibés par les extraits chloroformiques

ainsi que le filtrat de fermentation des souches de *Trichoderma* (Landreau, 2001; Blumenthal, 2004; Vinale *et al.* , 2006)

Le déploiement des modes d'action de *Trichoderma*, varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc...) (Caron, 2002).

## 6. Conclusion générale et perspectives

Le présent travail été dans la conception de la lutte biologique contre le champignon phytopathogène "le *Fusarium*". En effet, 8 champignons du genre *Fusarium*, ont été isolés à partir de différents organes et grains de plantes infectées, prélevées à partir de différentes zones en l'occurrence: Hamma Bouziane (Constantine), Tolgua (Biskra), Setif, Ben madhi (Gardaya), El-khroub (Constantine).

L'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques, alors que l'identification des espèces a été réalisé par voie moléculaire, au sein du laboratoire du LMBA (Laboratoire de Microbiologie et de Biomolécules Actifs). D'après les résultats d'affiliation, les huit souches pathogènes appartiennent à 3 espèces de *Fusarium* en l'occurrence; *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*.

L'isolement des microorganismes antagonistes, a été réalisé à partir trois sols agricole Algérien (Sud, Est et Nord).

Sur le nombre total de 80 isolats, dont 18 sont des bactéries, 8 sont des levures et 54 sont des moisissures, seulement 7 souches du genre *Trichoderma* ont présentées des propriété anti-*Fusarium*.

L'identification moléculaire des isolats, effectué au sein du laboratoire du LMBA, divise les 7 souches sur 5 principales espèces à savoir: *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*. Cette étude a, en effet, montré une diversité importante des espèces de *Trichoderma* en Algérie. **Cependant à notre connaissance, aucun travail n'a été publié sur l'isolement de *Trichoderma album*, *Trichoderma virens* et *Trichoderma longibrachiatum*, à partir du sol Algérien.**

L'effet de l'activité antagoniste des souches de *Trichoderma* contres les 8 espèces du *Fusarium* 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 55% à 72% selon les espèces pathogènes et antagonistes testées, alors que les résultats de la confrontation à distance montre des faibles pourcentages d'inhibition varient de 2% a 43%.

Les 7 souches de *Trichoderma* testées, montrent une capacité considérable de résistance sur les milieux a différents pH de 2 jusqu'au 9 , et ce après le test de pH effectué par deux

méthodes : sur milieu de culture liquide en utilisant le système BIOLOG, et sur milieu gélosé (PDA) préparé a différents pH.

Le test de l'activité enzymatique des souches antagonistes, prouve que les sept souches testées représentent une usine très importante des enzymes lytiques a savoir la chitinase, la cellulase, la protéase, la lipase et la laccase.

Le test de l'activité anti-*Fusarium*, des filtrats de cultures des souches antagonistes, montrent une faibles inhibition de la croissance mycélienne des souches pathogènes. Par ailleurs, cette étude a montré un changement remarquable de la couleur et de l'aspect des souches de *Fusarium* et ce, par tout les surnageants de culture des souches antagonistes testées, due aux métabolites secrétés par ces derniers dans les filtrats .

L'effet de l'extrait chloroformique des métabolites bioactifs des sept souches antagonistes, a été testé par la technique de BIOLOG ainsi par la technique des disques imbibés. Les résultats de ce test montrent une bonne activité inhibitrice des extraits, et ce, quelque soit la concentration utilisée (50 mg/ml, 25 mg/ml et 1mg/ml).

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* testées.

Enfin pour conclure, ce travail a fait l'objet d'une publication dans une revue de renommée dotée d'un IF ainsi que de plusieurs communications dans des congrès nationaux et internationaux.

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* pathogènes.
- Tester l'effet *in vivo* des souches *Trichoderma* isolées sur la croissance des *Fusarium* pathogènes .
- L'identification des métabolites bioactifs des *Trichoderma* isolées, par HPLC et spectrométrie de masse.
- Le test de l'activité antagoniste des métabolites bioactifs des *Trichoderma* isolées *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.

## 7. Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre le champignon phytopathogène "le *Fusarium*". 8 champignons du genre *Fusarium*, ont été isolés à partir de différents organes des plantes infectés. l'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques, alors que l'identification des espèces a été réalisé par voie moléculaire, au sein du laboratoire du LMBA (Laboratoire de Microbiologie et de Biomolécules Actifs).

En effet, d'après les résultats d'affiliation, les huit souches pathogènes appartiennent à 3 espèces de *Fusarium* en l'occurrence; *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*.

La lutte biologique contre ces phytopathogènes, est mise en évidence en utilisant 7 souches du genre *Trichoderma* isolées à partir de sols agricoles Algériens.

L'identification moléculaire des isolats, effectuée au sein du laboratoire du LMBA, divise les 7 souches sur 4 principales espèces à savoir: *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*. Cette étude a, en effet, montré une diversité importante des espèces de *Trichoderma* en Algérie. **Cependant à notre connaissance, aucun travail n'a été publié sur l'isolement de *Trichoderma album*, *Trichoderma virens* et *Trichoderma longibrachiatum*, à partir du sol Algérien.**

L'effet de l'activité antagoniste des souches de *Trichoderma* contre les 8 espèces de *Fusarium* isolé, a été étudié selon deux méthodes, confrontation directe et indirecte. Les résultats de la confrontation directe montrent un pourcentage d'inhibition varie de 55% à 72% selon les espèces pathogènes et antagonistes testées, alors que les résultats de la confrontation à distance montre des faibles pourcentage d'inhibition varient de 2% à 43%.

Les 7 souches de *Trichoderma* testées, montrent une capacité considérable de résistance sur les milieux à différents pH de 2 jusqu'à 9.

Le test de l'activité enzymatique des souches antagonistes, prouve que les sept souches testées représentent un ensemble très important des enzymes lytiques à savoir la chitinase, la cellulase, la protéase, la lipase et la laccase.

Le test de l'activité anti-*Fusarium*, des filtrats de cultures des souches antagonistes, montrent une faible inhibition de la croissance mycélienne des souches des pathogènes. Par ailleurs, cette étude a montré un changement remarquable de la couleur et de l'aspect des souches de *Fusarium* et ce, par tous les surnageants de culture testés.

L'effet de l'extrait chloroformique des sept souches antagonistes, a été testé par la technique de BIOLOG ainsi que par la technique des disques imbibés, montrent une bonne activité inhibitrice des extraits, et ce en quelque soit la concentration utilisée (50 mg/ml, 25 mg/ml et 1mg/ml).

**Mots clés:** *Fusarium*, Fusariose, lutte biologique, *Trichoderma*, BIOLOG, extraits fongiques.

## 8. Résumé en anglais

This study was carried out in order to fight against the phytopathogenic fungus "*Fusarium*". eight species from the genus *Fusarium* have been isolated from different organs of infected plants. genus identification was conducted using morphological characters, while the identification of species was performed by molecular pathway within the LMBA Laboratory (Laboratory of Microbiology and Biomolecules Assets).

Indeed, according to affiliation results, the eight pathogenic strains belong to three *Fusarium* species in the circumstances; *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*.

Biological control against the phytopathogens is highlighted using seven strains from the genus *Trichoderma* isolated from three Algerian agricultural soils.

The molecular identification of isolats conducted in the laboratory of LMBA has divided the seven strains into five main species: *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*. Indeed, This study showed a significant diversity of *Trichoderma* species in Algeria. However, to our knowledge, there are no previous published studies on the isolation of *Trichoderma album*, *Trichoderma virens* and *Trichoderma longibrachiatum*, from the Algerian soil.

The effect of the antagonist activity of *Trichoderma* strains against the eight isolated *Fusarium* species was studied using two methods, direct and indirect confrontation. Direct confrontation results show a percentage of inhibition ranging from 55% to 72% depending on the tested pathogenic and antagonists species, while the results of the confrontation from distance reveals low percentage of inhibition varied from 2% to 43%.

The seven tested *Trichoderma* strains show considerable capacity of resistance on the media with a different pH from 2 to 9. Enzymatic activity test of antagonistic strains shows that the seven tested strains represent very important sources of lytic enzymes namely chitinase, cellulase, protease, lipase and laccase.

Both test for anti-*Fusarium* activity, and culture filtrates antagonistic strains show a low inhibition of mycelial growth of pathogenic strains. Furthermore, this study showed a remarkable change of color and appearance of the *Fusarium* strains due to antagonistic metabolites.

chloroformic extract effect of the seven antagonistic strains, was tested by the BIOLOG technic and by the technical soaked disks, both techniques show a good inhibitory activity of the extracts, no matter what the concentration used is (50 mg / ml , 25 mg / ml and 1mg / ml).

**keywords:** *Fusarium* , biological control, *Trichoderma*, BIOLOG, fungal extracts.

## 8'. الملخص

ان هذه الدراسة قد تمت في اطار المكافحة البيولوجية ضد الفطريات المسببة للأمراض النبات من نوع *Fusarium* . وقد تم عزل 8 عزلات من جنس *Fusarium* من مختلف النباتات المصابة. وقد أجري تحديد الجنس باستخدام الصفات المورفولوجية، في حين تم إجراء تحديد الأنواع عن طريق البيولوجيا الجزيئية داخل مختبر LMBA (مختبر علم الأحياء الدقيقة والجزيئات الحيوية الفعالة).

في الواقع، وفقا لنتائج، فقد تم تقسيم والسلالات الثمانية المعزولة و المسببة للأمراض إلى ثلاثة أنواع الفيوزاريوم ؛

*Fusarium oxysporum* و *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani*

في اطار المكافحة البيولوجية ضد مسببات الأمراض النباتية المذكورة اعلاه, تم عزل 7 سلالات من جنس *Trichoderma* , من ثلاثة انواع من التربة الزراعية الجزائرية.

تحديد النوع الجزيئي للعزلة، الذي أجري في مختبر LMBA، يقسم 7 سلالات من 5 أنواع رئيسية هي *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*. وأظهرت هذه الدراسة في الواقع تنوع كبير من أنواع *Trichoderma longibrachiatum* في الجزائر. ومع ذلك، على حد علمنا، ولم يتم نشر أي حول العزلات *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma album*, *Trichoderma virens*, من التراب الجزائري. في نفس الاطار, تم دراسة تأثير النشاط الحيوي من سلالات *Trichoderma* على 8 أنواع *Fusarium* المعزولة وفقا طرق المواجهة المباشرة وغير المباشرة. نتائج المواجهات المباشرة تظهر نسب تثبيط تتراوح من 55% إلى 72% حسب الأنواع السلالات المسببة للأمراض و سلالات الخصوم المختبرة ، في حين أن نتائج المواجهة غير المباشرة تكشف نسبة تثبيط منخفضة مقارنة بالاولى تتراوح بين 2% إلى 43% تختلف باختلاف نوع السلالة الممرضة والمكافحة المختبرة.

وتشير دراسة تأثير حموضة الوسط على نمو سلالات *Trichoderma* قدرة هذه الاخيرة على النمو في جميع الاوساط ذات درجة الحموضة المختلفة من 2 الى 9. اختبار النشاط الأنزيمي من سلالات العدائية يدل على أن سلالات *Trichoderma* السبعة المختبرة قادرة على تصنيع مختلف الانزيمات التحليلية وهي كيتيناز، السيلولاز، البروتياز، الليباز ولاكاز. اختبار للنشاط مكافحة الفيوزاريوم عن طريق استعمال الرواشح تظهر ان رواشح الاوساط السلالات المكافحة قادرة على تثبيط نمو فطر السلالات المسببة للأمراض. وعلاوة على ذلك، أظهرت هذه الدراسة تغييرا ملحوظا في اللون والمظهر وشكل سلالات ال *Fusarium*. تأثير مستخلص الكلوروفورم من السلالات المكافحة السبعة، تم اختباره بواسطة تقنية BIOLOG والأقراص الغارقة تظهر النشاط المثبط للمستخلصات، وهذا مهما كان التركيز المستخدم (50 ملغ / مل ، 25 ملغ / مل و 1 ملغ / مل).

الكلمات المفتاحية : *Fusarium*، *Fusariose*، المكافحة البيولوجية، *Trichoderma*، BIOLOG، المستخلصات الفطرية

## 9. Références Bibliographiques

Abdelaziz W. 2005. Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Thèse de magistère, UMC.

Adams, T.H., J.K.Wieser, and J.H.Yu. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 35-54.

Adejuwon AO. 2011 – Nutritional factors affecting the production of  $\alpha$ -amylase in *Lasiodiplodia theobromae* Pat.. Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering 1, 131–135. 373

Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R.,*et al.* 2005. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. Journal of Eukaryotic Microbiology 52, 399-451.

Ahmed I, Hussain H, Schulz B, Draeger S, Padula D, Pescitelli G, van Ree, Krohn K. 2011. Three new antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp.. European Journal of Organic Chemistry 15, 808–812.

Alabouvette C. 2004. Les méthodes de protections des plantes alternatives à la lutte chimique. INRA, UMR Microbiologie Géochimie des Sols, BP 86510, 21065 Dijon Cedex.

Alabouvette C., Couteaudier Y. et Louvet J., 1983. Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16. XXIV.

Alhussaini MS. 2013. Mycobiota of wheat flour and detection of  $\alpha$ - Amylase and L-asparaginase enzymes. Life Science Journal 10, 1112–1122.

Alves-Santos FM, Benito EP, Elsava AP, Díaz-Mínguez JM. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 65:3335-3340.

Anonyme . 2005. Biskra Aden d'Algérie. [www.eden-algerie.com](http://www.eden-algerie.com).

- Appel IM, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. 2007. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethason on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 21, 2377–80.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., “Forme speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases”, in: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. et Cook, R.J. (Eds.) *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA, (1981), 391-399.
- Arnold AE, Lutzoni F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes, are tropical leaves biodiversity hotspots. *Ecology* 8, 541–549.
- Athauda SPB, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shiba C, Inoue H, Takahashi K. 2004. Erratum, Enzymatic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinase. *Biochemical Journal* 381, 295–306. Colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).
- Baayen RP. 2000. Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. *EPPO Bull.* 30:489-491
- Bakan B. 1998. Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*. Thèse, Université Paris-Grignon, France, 150 p.
- Barnett, H.L. and B.B, Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th ed. APS Press, St. Paul, MN.
- Bartnicki-Garcia, S., 2002. Hyphal tip growth. Outstanding questions. In: Osiewacz, Heinz D. (Ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 29e58.
- Beauvais A, Maubon D, Park S, Morelle W, Tanguy M, Huerre M, Perlin DS & Latge JP .2005. Two alpha(1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1531–1538
- Bechtel D.B., Kaleikau L.A., Gaines R.L. & Seitz L.M. 1985. The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry*, 62, 191-197.

Benchabane, M. 2005. "Caractérisation des effets d'antagonisme Microbienne et De promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents", Thèse Doctorat d'état, FSB-UTHB, Alger, 235p.

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.

Besselat B., 1985. Résultats obtenus par le service de la protection des végétaux dans le cadre de la lutte contre la pourriture grise de la vigne avec utilisation du *Trichoderma*. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, pp 51-58. INRA, Paris (FR).

Bhagobaty RK, Joshi, SR. 2012 – Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the pristine sacred forest of Meghalaya, India. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17, 33–40.

Bisset T, J A revision of the genus *Trichoderma*. 1991. La section *Pachybasium*. (a) *can.J. Bot.*, , 69: 2373-2417.

Booth C. 1985. The genus *Fusarium*. Ed. Commonwealth Mycological Institute. p. 237

Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, Volume 32, Issue 3, , Pages 314-331.

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.

Botton R, Breton A, Fevre M., Guy PH., Larpent J.P. et Veau P. 1985. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. *Biotechnologies*. Masson, p139 à 145.

Bouchet P., Guignard J.L. et Villard J., 2000. Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés. Edition Masson p77.

Brum MC, Araujo WL, Maki CS, Azevedo JL. 2012 . Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. („Niagara Rosada“) and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. Genetics and molecular research, GMR 11, 4187–4197.

Burgess L, R. Dodman, P. Mayers, et W Pont. 1981. *Fusarium* diseases of wheat, maize and grain sorghum in eastern Australia. Dans *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*'. Nelson, P., T Toussoun et R Cook (éds). University Park, Pennsylvania State University Pres. pp. 64-76.

Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, De Beer W, Wingfield MJ. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. Mycologia 98, 423–435.

Butkeraitis, P., Oliveira, C. A. F., Ledoux, D. R., Ogido, R., Albuquerque, R., Rosmaninho, J. F. & Rottinghaus, G. E. 2004. Effect of dietary fumonisin B-1 on laying Japanese quail. British Poultry Science 45, 798-801.

Cabezas L, Calderon C, Medina LM, Bahamon L, Cardenas M, Bernal AJ, Gonzalez A, Restrepo S. 2012 – Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. Journal of Microbiology 50, 1009–1013.

Cao R, Liu X, Gao K, Mendgen K, Kang Z, Gao J, Dai Y, Wang X. 2009 – Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in vitro*. Current Microbiology 59, 584–592.

Carlile M.J., Watkinson S.C. The Fungi. 1994. (Academic Press eds). Caron D. 2000. Fusarioses des épis, Sait-on prévoir leur développement. Perspectives Agricoles Janvier 2000, pp 56-62.

Carnegie A.J., Ades P.K., Ford R. 2001. The use of RAPD-PCR analysis for the differentiation of *Mycosphaerella* species from Eucalyptus in Australia, Mycological Research, Volume 105, Issue 11, Pages 1313-1320.

Caron D., Dupont De Dinechin L. et Malavergne D. 2006. *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs et en fonction du travail du sol. In: CR 8ème CIMA AFPP, Tours, France, pp. 293-303.

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.

Chabasse D., Guiguen C.I., Contet Audonneau N. 1999.Mycologie Médicale Eds Masson.

Champeil A., Dore T. et Fourbet J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. Plant Science, 166, 1389-1415.

Champion R.1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et Pratiques. 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.

Chermette R., Bussieras J.1993. Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort

Chet I., 1984. Application of *Trichoderma* as a bio control agent, pp. 110-111 Proc. 6th cong. un. Phytopathol. Mediterr. , Cairo (Egypt)

Chujo T, Scott B. 2014 – Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in fungal endophyte-plant symbiosis. Molecular Microbiology, DOI: 10.1111/mmi.12567.

Comporata .1985. « Antagonisme in vitro de *Trichoderma spp* vis à vis de *Rhizoctinia solani*, pp. 613-620. INRA Paris (FR),.

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.

D.K.D. Dalié, A. 2010. Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs. Thèse de doctorat : DISCIPLINE: BIOLOGIE, spécialité Alimentation et Nutrition.

Dai CC, Chem Y, Tian LS, Shi Y. 2010. Correlation between invasion by endophytic fungus *Phomopsis* sp. and enzyme production. African Journal of Agricultural Research 5, 1324–1330.

Dao K., 2013. Etude de la variabilité de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg isolé des semences paysannes de maïs au Burkina Faso et recherche de méthodes de lutte alternatives basées sur les extraits de plantes *in vitro*. Thèse DEA/GIRN.

Davet P. and Rouxel F. 1997. Detection et isolation des champignons du sol. , (edn INRA .Paris.

Davet P.1996. Vie microbienne du sol et production végétales, ( edn ) INRA. Paris.

Davidson FA, Sleeman BD, Rayner ADM, Crawford JW, Ritz K. 1996. Context dependent macroscopic patterns in growing and interacting mycelial networks. Proc. R. Soc. London Ser. B 263:873–80

De Kouassi. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique : Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Vertigo 2 :2 (2001).

De Kouassi. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique : Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Vertigo 2 :2 (2001).

Debbab A, Aly AH, Proksch P. 2012. Endophytes and associated marine derived fungi

Del Palacio H.A., Gutierrez A., Gutierrez E.,1985. Ulcera corneal pour *Fusarium solani*, Rev. Iber. Micol., 2, 29-35

- Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R. 2011. Characterization of Cd- and Pb- resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 2-3, 717–724.
- Denis C. et Webster I., 1971. « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 5741-48.
- Desjardins, A. E., Brown, D. W., Yun, S. H., Proctor, R. H., Lee, T., Plattner, R. D., Lu, S. W. et Turgeon, B. G. 2004. Deletion and complementation of the mating type (MAT) locus of the wheat head blight pathogen *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2437-2444.
- Desjardins, A. E., Jarosz, A. M., Plattner, R. D., Alexander, N. J., Brown, D. W. et Jurgenson, J. E. 2004. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6341-6346.
- Desjardins, A. E., Maragos, C. M. et Proctor, R. H. 2006. Maize ear rot and moniliformin contamination by cryptic species of *Fusarium subglutinans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7383-7390.
- Djerbi, M. (1982). Bayoud disease in North Africa: history distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal* 1, 153-197.
- 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).
- Dubourdiou D., 1983. Dégradation du glucane de *Botrytis cinerea* par les  $\beta$ 13 glucanase de *Trichoderma* sp., pp 35-49. XXIV colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).
- Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M., (1989), *Fusarium moniliforme keratitis*, *Acta ophthalmol., Scand.* 67, 710-713
- Durrieu G. <http://www.associationmycologiquetoulouse.ups-tlse.fr/spip.php?article23> (2008)

ecological and chemical perspectives. *Fungal Diversity*, DOI: 10.1007/s13225-012-0191-8.

Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A. 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* 57, 2775–2784.

El Hadrami I, Bellaj M., Idrissi A., J'Aiti F., Jaafari S. et Daayf F. (1998) Biotechnologie végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactilifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers Agriculture*. 7 (6): 463-468.

Esposito, e. et silva, m. 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.

Fisher PJ, Petrini O, Sutton, BC. 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia* 45, 338–345.

Fu J, Zhou Y, Li H-F, Ye Y-H, Guo J-H. 2011. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. *African Journal of Microbiology Research* 5,1231–1236.

Gams, W. et Bissett, j. 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.

Gangadevi V, Muthumary J. 2008. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica* 5, 1–4.

Gargouri, S. 2003. Evaluation de l'incidence de la pourriture du pied du blé et de la structure des populations des espèces de *Fusarium* associées à la maladie. Thèse en Biologie végétale, Faculté des sciences de Tunis, Tunis, Tunisie, 94 p.

Gargouri, S., M.R. Hajlaoui, A. Guermech et M. Marrakchi. 2001. Identification des espèces fongiques associées à la pourriture du pied du blé et étude de leur répartition selon les étages bioclimatiques en Tunisie. Bulletin OEPP, Tunis, Tunisie, 31: 499-503.

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

Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Jamaluddin K, Awasthi MK, Sarsaiya S. 2011. Optimization for the production of cellulose enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. Biotechnology Research International. doi,10.4061/2011/810425.

Gazis R, Chaverri P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecology 3, 240–254.

Genilloud, O., Pelaez, F., Genzalez, i.&. Diez, m.t. Diversity on actinomycetes and seaweeds from the Iberian coasts. Microbiologia, 1994, 10: 413-422

Ghodbane, A., M. Mahjoub, M. Djerbi, A. Mlaiki et A.L. Sharen. 1974. Project on Septoria and Root Rot. Montana State University, Montana, États-Unis, pp. 64-76.

Girbardt, M., 1957. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). Planta 50, 47e59

Glen A, Bodri MS. 2012. Fungal endophyte diversity in *Sarracenia*. PLoS ONE 7, art no. e32980. Gunatilaka AAL 2006. Natural products from plant-associated microorganisms, Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. Journal of Natural Products 69, 509–526.

Gonçalves, A.B., Paterson, R.R.M. et Lima, N., 2006. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 209: 257-264.

Goncalves, C. A. ; Rodrigues Filho, J. A. ; Camarao, A. P. ; Azevedo, G. P. C. de, 2005. Evaluation of *Panicum maximum* cv. Tobiata pasture to milk production of under two levels of concentrate supplementation in the Northeast of the State of Para. Documentos - Embrapa Amazonia Oriental (39): 35 pp. 2005

Goswami R.S. et Kistler H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology, 5, 515-525.

Grant C., Hunter C.A., Flannigan B. and Bravery A.F. 1988. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. Int. Biodeterioration, 25: 259-84.

Gregory, P.H., 1984. The fungal mycelium: an historical perspective. In: Jennings, D.H., Rayner, A.D.M. (Eds.), The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. Cambridge University Press, pp. 1e22

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.

Gull K. 1978,, Form and function of septa in filamentous fungi. In: J.E. Smith and D.R. Berry, Editors, The Filamentous Fungi: Development Mycology, Wiley and Sons, New York pp. 78–93.

Haan LAM, Numansen A, Roebroek EJA, van Doorn J. 2000. PCR detection of *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli* race 1, causal agent of Gladiolus yellows disease, from infected corms. Plant Pathol. 49:89- 100

Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Rehman G, Kim Y-H, Iqbal L, Hussain J, Lee I-J, Sohn E-Y. 2010 – Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). Mycologia 102, 989–995.

Hangavelu R., Palaniswami A., Velazhahan R., Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana, Agriculture, Ecosystems and Environment, Volume 103, Issue 1, 2004, Pages 259-263.

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.

Hatsch D. 2004. Interaction hôte/pathogène : étude du modèle *Humulus lupulus* / *Fusarium graminearum*. Identification, génomique et transcriptomique du pathogène. Thèse de doctorat.

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.

Hazalin NAMN, Ramasamy K, Lim SM, Wahab IA, Cole ALJ, Majeed ABA. 2009 – Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine, doi: 10.1186/1472-6882-9-46.

Hegde SV, Ramesha A, Srinvas C. 2011 - Optimization of amylase production from endophytic fungi *Discosia* sp. isolated from *Calophyllum inophyllum*. Journal of Agricultural Technology 7, 805-813.

- Hibar K. 2002. La fusariose du collet et des racines de la tomate : pathogénicité et moyens de lutte. Mémoire de Diplôme d'études approfondies en Protection des Plantes et Environnement. Tunisie : Ecole supérieure d'Horticulture et d'élevage de Chott Mariem, 54 p.
- 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. radicislycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2005 9 (3), 163–171.
- Hina Zafar, S. Shahid Shaukat et Toqeer Ahmed Rao. 2013. antagonistic activity of cultural filtrates of five *Trichoderma* species against pathogenic fungus *Alternaria solani*. INT. J. BIOL. BIOTCH.,10 (4): 547-551, 2013.
- 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/EPPPO Bull. 26, p. 697–705
- Hoffman MT, Gunatilaka MK, Wijeratne K, Gunatilaka L, Arnold AE. 2013 – Endohyphal Bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. PLoS ONE 8(9): e73132, doi:10.1371/journal.pone.0073132
- Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87, p. 4–10.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. 2008 – Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. Fungal Diversity 33, 61–75.
- Ignoffo, C. M. 1970. Proceedings of the Tall Timbers Conference on Ecology of Animal Contributions by Habitat Management, Tallahassee, Florida. Tall Timbers Research Station: 47-57.
- Ignoffo, C. M. 1970. Proceedings of the Tall Timbers Conference on Ecology of Animal Contributions by Habitat Management, Tallahassee, Florida. Tall Timbers Research Station: 47-57.
- Ignoffo, C. M. 1973. Effects of Entomopathogens on Vertebrates. Ann. N. Y. Acad. Sci., 217: 141-165.
- Ignoffo, C. M., 1973. Vertebrates and entomopathogens, Ann. N.Y. Acad. Sci., 217, 165.

Islam S, Akanda AM, Prova A, Sultana F, Hossain MM. 2014. Growth promotion effect of *Fusarium* spp. PFF1 from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) rhizosphere on Indian spinach (*Basella alba*) seedlings are linked to root colonization. Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: 10.1080/03235408.2013.876745

Joel El, Bhimba BV. 2012. Production of alpha amylase by mangrove associated fungi *Pestalotiopsis microspora* strain VB5 and *Aspergillus oryzae* strain VB6. Indian Journal of Geo-Marine Sciences 41, 279–283.

Jourdheuil, P., P. Grison et A. Fraval. 1992. La lutte biologique: un aperçu historique. La lutte biologique. Dossier de la Cellule environnement de l'INRA 5,11-35.

Justa-Schuch, D., Heilig, Y., Richthammer, C., Seiler, S., 2010. Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. Mol. Microbiol. 76, 220e235

Kamalraj S, Muthumary J. 2012. Screening and identification of potential Coelomycetous strains for the production of extracellular antimicrobial metabolites. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5, 137–145.

Kamiya A., Kikuchi A., Tomita Y., Kanbe T. 2004. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis, Journal of Dermatological Science, Volume 34, Issue 1, Pages 35-48.

Kendrick, K. M. 2000. Oxytocin, motherhood and bonding. *Exp. Physiol.* 85(Suppl.) 111S–124S.

Khan AL, Waqas M, Hussain J, Al-Harrasi A, Lee IJ. 2014. Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 can reduce cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* (Sitiens and Rhe). Biology and Fertility of Soils 50(1), 75–85. Kendrick B. (2000). The fifth kingdom. Troisième Eds.

Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B. & Holst-Jensen, A. (2005). Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological Research 109, 173-186.

Kubicek, C.P ; Bissett, J. ; Druzhinina, I., Kullinig-Gradinger, C. et Szakacs, G. 2003. Genetic and métabolic diversity of *Trichoderma sp.*; a case study on south-east asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, , 38 (3): 310-319.

Kuntal A, Kumar N. 2012. Impact of metal ions on the degradation of agrowaste by *Aspergillus terreus*. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6, 1327–1332.

Kusari P, Kusari S, Spiteller M, Kayser O. 2012. Endophytic fungi harboured in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity*, DOI: 10.1007/s13225-012-0216-3

Kusari S. Lamshoft M, Zühlke S, Spiteller M, 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products* 71, 159–162.

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.

Landreau, A. 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 : 2001,201 P

Leuchtmann, A. ; petrini,O. et samuels, g. Isozymes subgroups in *Trichoderma* section Longibrachiatum. *Mycologia*, 1996, 88 (3) : 384-394

Li E, Jiang L, Guo L, Zhang H, Che Y. 2008. Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16, 7894–7899 375

Li H-Y, Zhao C-A, Liu C-J, Xu, X-F. 2010. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. *Journal of Microbiology* 1, 1-6.

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.

Madelin T.M. 1994. Fungal aerosols: a review. *Journal of aerosol science*. 25: 1405-1412.

Mandyam K, Loughin T, Jumpponen A. 2010. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia* 102, 813–821.

Mar Jimenez-Gasco M.D., Jimenez-Diaz R.M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6, *Phytopathology*, Volume 93, Issue 2, Pages 200-209

Maria GL, Sridhar KR, Raviraja NS. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology* 1, 67–80. *Microbial Ecology* 2, 404-416.

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)

Mathur S. B. et Kongsdal O., 2003. Common laboratory seed health testing methods for detection fungi. First edition, Kandrups Bogtrykkeri edition. 436p.

Messiaen C.M et Cassini R, 1968. Recherche sur les Fusarioses. IV La systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiphyties* 19 : 387-454.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.

Miller, S. S., Chabot, D. et Ouellet, T. 2004. Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology* 26, 453 - 463.

Mohan JA, Clarke CM. 2010. The carnivorous syndrome in *Nepenthes* pitcher plants. *Plant Signaling & Behavior* 5, 644–648.

Mohana KP, Sebastian V, Vaidyanathan P, Thimmappa RB, Singh S, Gudasalamani R, Ramesh V, Retnabai ST, Michael S, Uma SR. 2012. *Fusarium proliferatum* an endophytic fungus from *Dyxolum binetariferum* Hook.f produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 323–329.

Morohoshi T, Oikawa M, Sato S, Kikuchi N, Kato N, Ikeda T. 2011. Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112, 315–350.

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.

Mueller Gregory et Schmit John Paul. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity Conservation* 16:1-5

Munaut, F. & Hove, F. v. 2004. Diversity in pathogenicity and mycotoxin production of the *Gibberella fujikuroi* group in the tropics. *Bulletin des Seances, Academie Royale des Sciences d'Outre- Mer* 50, 127-139.

Nelson P. E., 1991. History of *Fusarium* systematic. *The American Phytopathological Society*, 81 (9), 1045-1048.

Nelson P.E., Toussoun T.A. et Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species. An illustrated manuel for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pa, 193pp.

Nwe, N.; Stevens, W. F.; Tokura, S. et Tamura, H. 2008. Characterization of chitin and chitosan-glucan complex extracted from cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 242- 251.22, 31, 94

O'Donnell, K., Kistler, H., Cigelnik, E. et Ploetz, R. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 95, 2044-2049.

Ogido, R., Oliveira, C. A. F., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Correa, B., Butkeraitis, P., Reis, T. A., Goncales, E. et Albuquerque, R. 2004. Effects of prolonged administration of aflatoxin B-1 and fumonisin B-1 in laying Japanese quail. *Poultry Science* 83, 1953-1958.

Okay S, Tefon BE, Ozkan M, Ozcengiz G. 2008. Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 161–170.

Orlandelli RC, Alberto RN, Rubin Filho CJ, Pamphile JA. 2012. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research* 11, 1575–1585.

Ortoneda M, Guarro J, Madrid M, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, Di Pietro A. 2003. *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infect. Immun.* 72:1760–1766.

Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology Application Biochemistry* 31, 135–152.

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

Parry D.W., Jenkinson P. et McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.

Pauvert, P. 1984. Les fusarioses des céréales. *Phytoma*, 202: 15-16.

Pavlovic A 2012. Adaptive radiation with regard to nutrient sequestration strategies in the carnivorous plants of the genus *Nepenthes*. *Plant Signalling and Behavior* 7, 295–297.

- Pavlovic A, Slovakova L, Santrucek J. 2011. Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant, Cell and Environment* 34, 1865–1873.
- Pdsa. 2012. Manuel de pathologie des semences. Agence Internationale de Coopération Japonaise (JICA) et Ministère de l'Agriculture et de l'Hydraulique, Ouagadougou, Burkina Faso, 77p.
- Pirgozliev S.R., Edwards S.G., Hare M.C. et Jenkinson P. (2003) Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731-742.
- Pitt J.I., 2000, Toxigenic fungi and mycotoxins, *Br. Med. Bull.*, 56 (1), 184 - 192.
- Postma F, Mesjasz- Przybylowicz J, Przybylowicz W, Stone W, Mouton M, Botha A. 2012. Symbiotic interactions of culturable microbes with the nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* and the herbivorous insect *Chrysolina clathrata*. *Symbiosis* 58, 209–220.
- Praptiwi, Jamal Y, Fathoni A, Nurkanto A, and Agusta A. 2013. 3-Acetyl-2,5,7-Trihydroxyl-1,4-naphtalenedione
- Prieto, A, leal, J.A, Poeda, A., Jiménez-Barbero, J., Gomez-Miranda, B., Domenech, J, Ahrazem, O., & Berabé, M structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and hypocrea species. *Carbohydrate Research* 1997, 304 (3-4) : 281-291
- Qualhato TF, Lopes FAC, Steindorff AS, Brandao RS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi, Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 35, 1461–1468.
- Quilliam RS, Jones DL. 2010. Fungal root endophytes of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Mycorrhiza* 20, 341-348.
- Quilliam RS. Jones DL. 2012. Evidence for host-specificity of culturable fungal root endophytes from the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris* (Common Butterwort). *Mycological Progress* 11, 583–585.

Rahman MA, Begum MF, Alam MF. 2009. Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystic paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. *Microbiology* 37, 277–285.

Raju BGS, Rao GH, Ayyanna C. 1993. Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA using *Aspergillus oryzae*. CBS Publishers, Visakhapatnam, India, pp. 106-110. 376

Ramírez-S.2009. Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. thèse de doctorat.

Rapilly F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyt.*, 101 p.

Redecker D. 2002. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil.

Research in Microbiology. 153: 125-130. Rifai, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers*, 1969, 116: 1-56

Roquebert M.-F. 2002. Moisissures contaminant les biens culturels. Collection Patrimoine. Heritage Series

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 .

Rosa LH, Almeida Vieira MDL, Santiago IF, Rosa CA . 2010. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 178–189.

Rouxel, F., Alabouvette, C., Louvet, J.1979. “Recherches sur la résistance des sols aux maladies. II - Incidence de traitements thermiques sur la résistance microbologique d'un sol à la Fusariose vasculaire du melon”, *Ann Phytopathol.*, 183-192.

Salami AO, Akintokun AK. 2008. Post-harvest enzymatic activities of healthy and infected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tubers. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 20, 1–17.

Samson R.A. and Hoekstra E.S. 1988. Introduction to food –born fungi , 3 edn . Centraalbureau 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.

Sandgren, M.; Stahlberg, J. et Mitchinson, C. ., 2005 Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Bio*, 89 : 246-291

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.

Schaafsma, A. W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J. D. & Hooker, D. C. 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23, 279-285.

Schaumann, K. Marine pilze. 1993. IN : *Mikrobiologie des meeresbodens*. Meyer-Reil L.A. und Koster M. Jena : Gustav Fischer Verlag, 144-195.

Schmale , D. G., Arntsen, Q. A. et Bergstrom, G. C. 2005. The forcible discharge distance of ascospores of Gibberellazeae. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27, 376 - 383.

Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN. 2006. *Microbial root endophytes*. Springer Berlin Heidelberg, Germany.

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

Sharaf EF, El-Sarrany AEQ, El-Deeb M. 2012. Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase. *African Journal of Microbiology Research* 21, 4538–4545.

Siberry GK, Costarangos C, Cohen BA. 1997. Destruction of the nasal septum by *Aspergillus* infection after autologous bone marrow transplantation. *N Engl J Med*;337: 275-6.

Silva GH, Teles HL, Zanardi LM, Marx YMC, Eberlin MN, Hadad R, Pfenning LH, Costa-Neto CM, Castro-Gamboa I, Bolzani YS, Araujo AR. 2006. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassia*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry* 67, 1964–1969.

Silva HAS, Tozzi JPL, Terrasan CRF, Bettiol W. 2012. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control* 63(1), 62–67.

Simpson A.G.B. and Roger A.J. 2004. Excavata and the origin of amitochondriate eukaryotes. In *Organelles, Genomes, and Eukaryote Phylogeny: An Evolutionary Synthesis in the Age of Genomics*, R.P. Hirt and D.S. Horner, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 27-54.

Simpson A.G.B., Roger A.J. 2002 . Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Current Biology*. 12, R691-R693.

Simpson A.G.B.; Roger A.J. 2004. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology* .14, R693-696.

Singh A, Shahid M, Srivastava M, Pandey S, Sharma A, *et al.* 2014. Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virol Mycol* 3:127. doi: 10.4172/2161-0517.1000127.

Singh LP, Gill SS, Tetuje N. 2011. Unravelling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signalling & Behavior* 6, 175–191.

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 handbook 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.

Stephenson P, Hogan J. 2006. Cloning and characterization of a ribonuclease, a cysteine proteinase, and an aspartic proteinase from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes ventricosa* blanco. International Journal of Plant Sciences 167, 239–248.

Suderman RJ, Dittmer NT, Kramer KJ, Kanost MR. 2010. Model reactions for insect cuticle sclerotization, participation of amino groups in the cross-linking of *Manduca sexta* cuticle protein MsCP36. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40, 252–258.

Sugiyama, J. 1987. Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo: Elsevier, pp. 29-56, 325 p.

Sutton, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of plant pathology 195, 195 - 209.

Takeuchi Y, Salcher MM, Ushio M, Shimizu-Inatsugi R, Kobayashi MJ, Diway B, von Mering C, Pernthaler J, Shimizu KK. 2011. In situ enzyme activity in the dissolved and particulate fraction of the fluid from four pitcher plant species of the genus *Nepenthes*. PLoS ONE 6, e25144.

Thangavelu R., Palaniswami A., Velazhahan R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana, Agriculture, Ecosystems and Environment, Volume 103, Issue 1, Pages 259-263.

Theantana H, Hyde KD, Lumyong S. 2007. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. KMITL Science and Technology Journal 7, 13–18.

Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan TS, Murali TS, Ravishankar JP, Gummadi SN. 2011. L- asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. Mycophere 2, 147-155.

Thomas P.A., Geraldine P. 1992. Fungal keratitis due *Fusarium* and other fungi, J. Mycol. Med., 2, 121-131

Tintjer T, Rudgers JA. 2006. Grass-herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. New Phytologist 170, 513–521.

Tokes ZA, Woon WC, Chambers SM. 1974. Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L.. Planta 1 19, 39–46.

Tran, S. T., Auvergne, A., Benard, G., Bailly, J. D., Tardieu, D., Babile, R. et Guerre, P. 2005. Chronic effects of fumonisin B-1 on ducks. Poultry Science 84, 22-28.

Trinci, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. Microbiology 57, 11e24.

U'Ren, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD, Elizabeth Arnold A. 2012. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. American Journal of Botany 99, 898–914.

Valentina Catalano, Sabrina Sarrocco, Mariarosaria Vergara et Giovanni Vannacci. 2007. Enzymatic functions and mycoparasitism *versus sclerotia* in *Trichoderma*. Journal of Plant Pathology 89 (3, Suppl.), S14-S14.

Vedashree S, Sateesh MK, Lakshmeesha TR, Mohammed SS, Vedamurthy AK. 2013. Screening and assay of extracellular enzymes in *Phomopsis azadirachtae* causing die-back disease of neem. Journal of Agricultural Technology 9, 915–927.

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

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

Weindling, R. et H. Emerson. 1936. the isolation of toxic substance from the culture filtrates of *Trichoderma*. Phytopathology, 26: 1068-1070.

Widden, P. et Abitbol, J.J. 1980. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. Mycologia, 72 : 775-784

Wollenweber H.W. et Reiking O.A., 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung aund Bekämpfung. Paul Parey. Berlin 335p.

Wood M. 2002. Gene jockey fight *Fusarium* head blight. Agricultural Research, 50, 12-13.

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

Zyska B. 1997. Fungi isolated from library materials: a review of the litterrature. Int Biodeter and Biodegrad 40: 43-51

# 10. Annex1

## 1. Milieux de cultures

### Milieux d'isolement

#### Milieu PDA Potatoes Dextrose Agar

- Pomme de terre 200g
- Eau distillée 500ml.
- Saccharose 10g
- Agar 15g
- Eau distillée 1000ml
- Ph 6

#### Milieu MEA

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

#### Milieu SABOUREAUD

- Peptone 10g
- Agar 20g
- Glucose 20g
- Eau distillée 1000 ml

#### Milieu Czapeck dox

- NaNO<sub>3</sub> 10g
- KCl 0,5g
- MgSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub> 0,5g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g
- FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,001g

- Saccharose            30g
- agar                    20g
- eau distillée        1000 ml
- Ph                      6

### **Milieu pour test de pH**

#### **Milieu Sabouraud liquide**

- Peptone                10g
- Glucose                20g
- Eau distillée        1000 ml

### **Milieu de fermentation**

#### **Milieu PDB potato dextrose broth**

- Extrait liquide de pomme de terre    1000 ml de
- D-glucose                                20 g

#### **Milieu chitinase** Kotasthane et Agrawal, (2009).

- chitin colloidal                        4.5 g
- MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O,                        0.3 g
- (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>,                                3.0 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,                                    2.0 g
- Acid citric monohydrate            1 g
- Agar,                                        15 g
- Rouge phénol                            0.15 g
- tween-80                                 200 µl

### **Milieu cellulase**

cellulose	5g
Agar	20g
Eau distillée stérile	1000 ml

### **Milieu protéase**

13.5g agar	dans 600 ml Eau distillée
10.5g lait en poudre	dans 350 ml Eau distillée

### **Milieu lipase** Haliru et Bukola, 2012.

peptone	10g
NaCl	5g
Calcium chloride;	0.1g
Tributyryn,	1ml
Agar,	20g
Rouge Congo,	0.5g
Eau distillée,	1000 ml.

## Annexe 2

Tableau Affiliation phylogénétique des isolats pathogènes (paires d'amorces universelles)

Designation	Blast ncbi	N accessio n	% identité	Séquences
TC	<i>Trichoderma album</i>	JF304318	100	CCAACCCATGTGACGTTACCAA ACTGTTGCCTCGGC GGGATCTCTGCCCC GGGTGCGTCGCAG CCCCGGACCAA GGCGCCCGCCGG GAGGACCAACCAA AACTCTTATTGT ATAACCCCTCGCG GGTTTTTTTATA AATCTGAGCCTT CTC GGCGCCTCTCGT AGGCGTTTCGAAA ATGAATCAAACT TTCAACAACGG ATCTCTTGTTCT GGCATCGATGAA GAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTA ATGTGAATTGC AGAATTCAGTGA ATCATCGAATCT TTGAACGCACAT TGC GCCCCGCCAGT ATTCTGGCGGG CATG CCTGTCCGAGC GTCATTTCAACC CT CGAACCCCTCC GGGGGGTTCGG CGT TGGGGATCGGC CCTCCTTA
TB	<i>Trichoderma harzianum</i>	JX518920.1	100	AAATTTCTCGGGG AGTGC ACTCCAAC CCATGTGACGTT ACCAA ACTGTTGC CTCGGC GGGATCTCTG CCCCGGGTG CGTCGCAGCC CCGGACCAAG GGCGC CCGCCGGAGG ACCAACCAA AACTC TTATTGTATA ACCCCTCGCG GGTTTT TTTTATAATCT GAGCCTTCTC GGCG CCTCTCGTAG GGCGTTTCGAA AATGA ATCAAACTTT CAACAACGG ATCTC TTGGTTCTGG CATCGATGAAG AACG CAGCGAAATG CGATAAGTA ATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCG AATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCCG CCAGTATTCT GGCGGGCATG CCTGT CCGAGCGTC ATTTCAACC CTCGAAC CCCTCCGGGG GGTTCGGCG TTGGGG ATCGGCCCTC CCTTAGCGGG GTGGC CGTCTCCGAA ATACAGTGGC GGTCT

				CTCCCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGT TTGCCCACTCGCA
Th	<i>Trichoderma virens</i>	KF69180 3.1	99	TCGTGGGCGTTTTCGAAAATGAATCA AAACTTTCCACAACGGATCTCTTGG TTCTGGATCGATGAAGAACGCAGC GAAATGCGATAAGTAATGTGAATT GCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA GTATTCTGG
TT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF90878 7.1	100	CCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGG AGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTT CTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGG CTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCT TTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCT CGAAAATGAATCAAACTTTCAAC AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT AACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGT CGGCGTTG
TT2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF90878 7.1	98	AAACAACCCCGGATCCCATGGCGC CCGCCGGAGGACCAACTCCAAACT CTTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCC GTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTG TGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCG GGCGTCTCGGAGATGAATCAAAC TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT GGCATCGATGAAAAACGCATCGAA ATGCGATAAGTAATGTG
TT1''	<i>Trichoderma viride</i>	KF72361 0.1	99	TCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTC TGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTC TCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCG AAAATGAATCAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT GAAAAACGCAGCGAAATGCGATAA

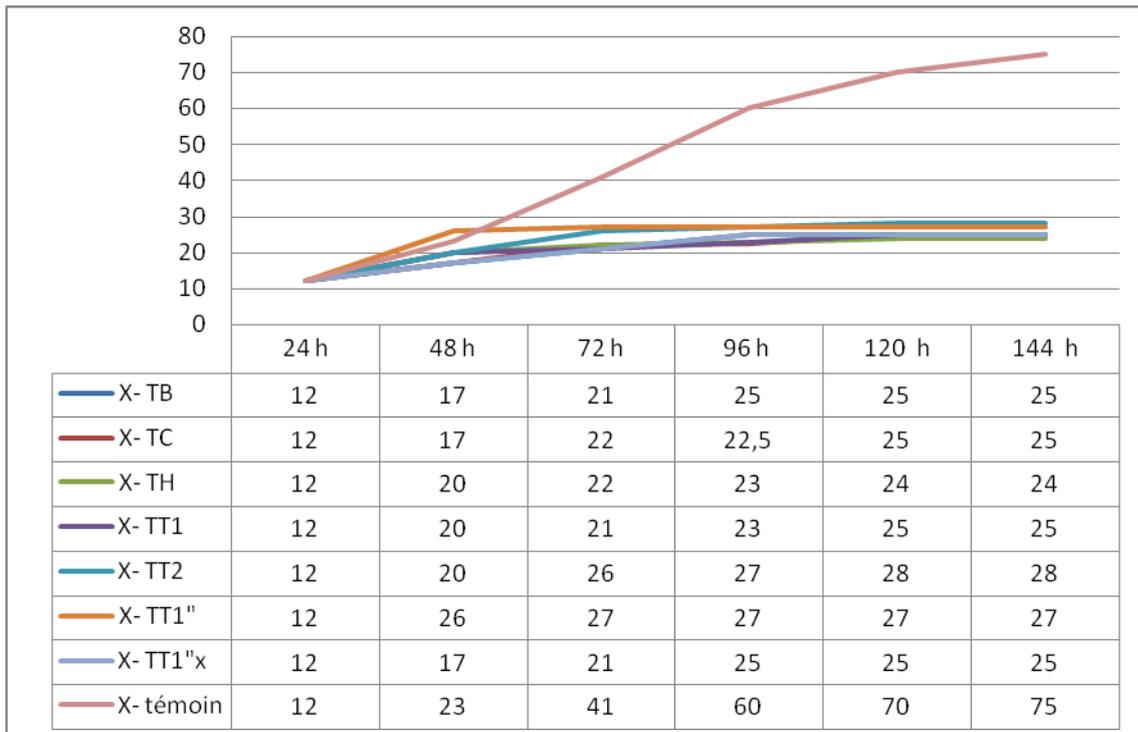
				GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG AATCATCGAA
TT1''x	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF90878 7.1	99	GCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCC GCCGGAGGACCAACTCCAAACTCT TTTTTCTCTCCGTCGCGGGCTCCCGT CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTG AGCCTTTCTCGGGCACCCTAGCGGG CGTCTCGAAAATGAATCAAACTTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA TTCAGTGAATCATCGAA
X	<i>Fusarium verticillioides</i>	KF49413 5.1	99	CCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGT TTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAA CCATAAATAAATCAAACTTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCAAAATGCGAT AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTC AACCTCAAGCCCAGCTTGGTGTG GGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCC CCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGA GCTTCCATAGCGTATAATAAAACCC TCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCA CGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAAT GTTGACCTCGGATCAAGTAGGAAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGC
X'	<i>Fusarium verticillioides</i>	KJ69910 9.1	100	GCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTC TGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTA AAACCATAAATAAATCAAACTTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCAAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT GGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC ATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGG TGTTGGGACTCGCGAGTCAAATCGC GTTCCCAAATTGATTGGCGGTCAC

				GTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTA AAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCG CGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTT CTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTA GGAA
FP2	<i>Fusarium keratoplastic um</i>	KF25542 5.1	100	>FP2 CCCCCGCCAGAGGACCCCCTAACTC TGTTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTA AAACAAGCAAATAAATTA AAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGG CATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTC TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC ATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCC CGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCCG CCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCC AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCA GCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACAC CTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGGC CACGCCGTA AAACACCCAACTTCTG AATGTTGACCTCGAATCAGGTAGG AATACCCGCTGAACTT
Rpal	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC3296 16.1	100	CCTGTGACATACCTAAACGTTGCTT CGGCGGGAACAGACGGCCCTGTAA CAACGGGCCCGCCCCGCCAGAGGA CCCCTAACTCTGTTTTTATAATGTTT TTCTGAGTAAACAAGCAAATAAAT TAAACTTTCAACAACGGATCTCTT GGCTCTGGCATCGATGAAGAACGC AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCC CCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGG CAGAAGCCCCCTGTGGGCACACGC CGTCCCTCAAATACAGTGGCGGTC CCGCCGAGCTTCCATTGCGTAGTA GCTAACACCTCGCAACTGGAGAGC GGCGCGGCCATGCCGTA AAACACC

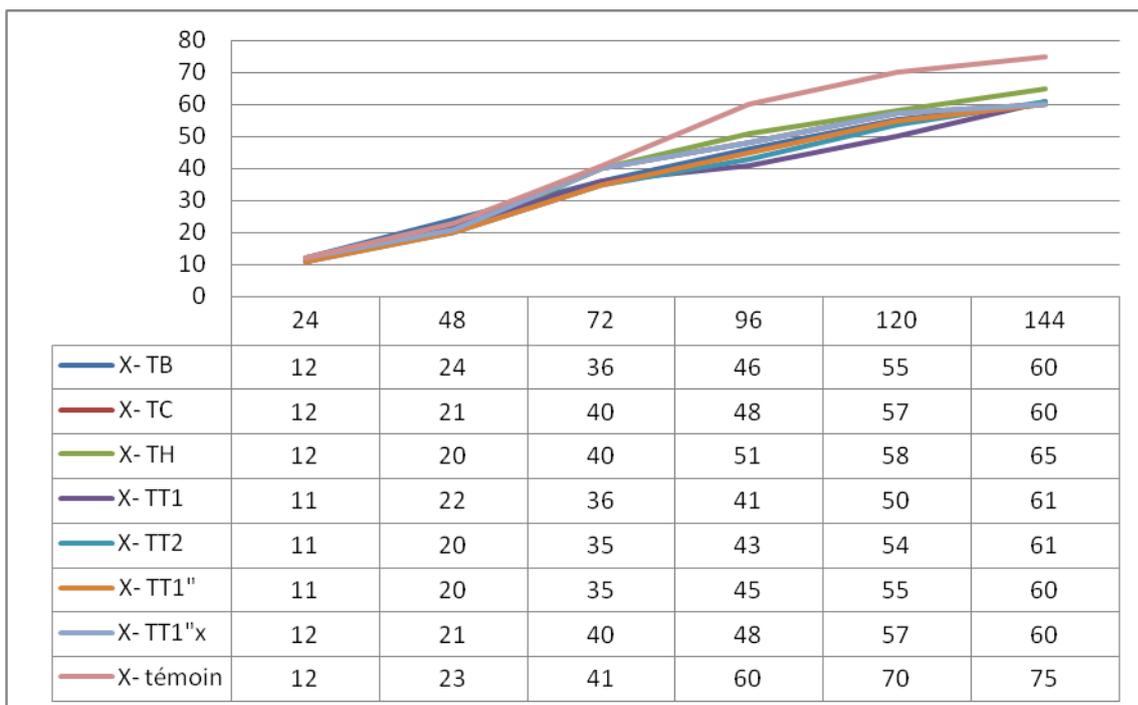
				CAACTTCTGAATGTTGACCTCGAAT CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAA
GH	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF86455 5.1	99	AAATAAATCAAACACTTTCAACAAC GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG AAGAACGCAGCAAATGCGATGAG TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA ATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC CCTCAAGCACAGC
FO	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	KF25542 5.1	100	>FO CCCCCGCCAGAGGACCCCCTAACTC TGTTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTA AAACAAGCAAATAAATTA AAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGG CATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTC TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC ATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCC CGGCGTTGGGGATCGGGCAGGGCGC CCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCCC AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCA GCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACAC CTCGAACTGGAGAGCGGCGCGGC CACGCCGTAAAACACCCA ACTTCTG AATGTTGACCTCGAATCAGGTAGG AATACCCGCTGAACT
FGH	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	KF25542 5.1	100	>FGH CCCCCGCCAGAGGACCCCCTAACTC TGTTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTA AAACAAGCAAATAAATTA AAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGG CATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTC TGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC

				ATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCC CGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCGC CCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCC AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCA GCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACAC CTCGCAACTGGAGAGCGGGCGCGGC CACGCCGTAAAACACCCAATTCTG AATGTTGACCTCGAATCAGGTAGG AATACCCGCTGAACTTAAG
FGB	<i>Fusarium oxysporum</i>	KJ938022.1	100	>FGB CCCTGTGACATAACCACTTGTTGCCT CGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTA AAACGGGACGGCCCGCCAGAGGAC CCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAA CTTCTGAGTAAAACCATAAATAAAT CAAACTTTCAACAACGGATCTCTT GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC AGCAAAATGCGATAAGTAATGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTA ATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGC GGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTA GTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAA TCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCC CAACTTCTGAATGTTGACCTCGGAT CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATC

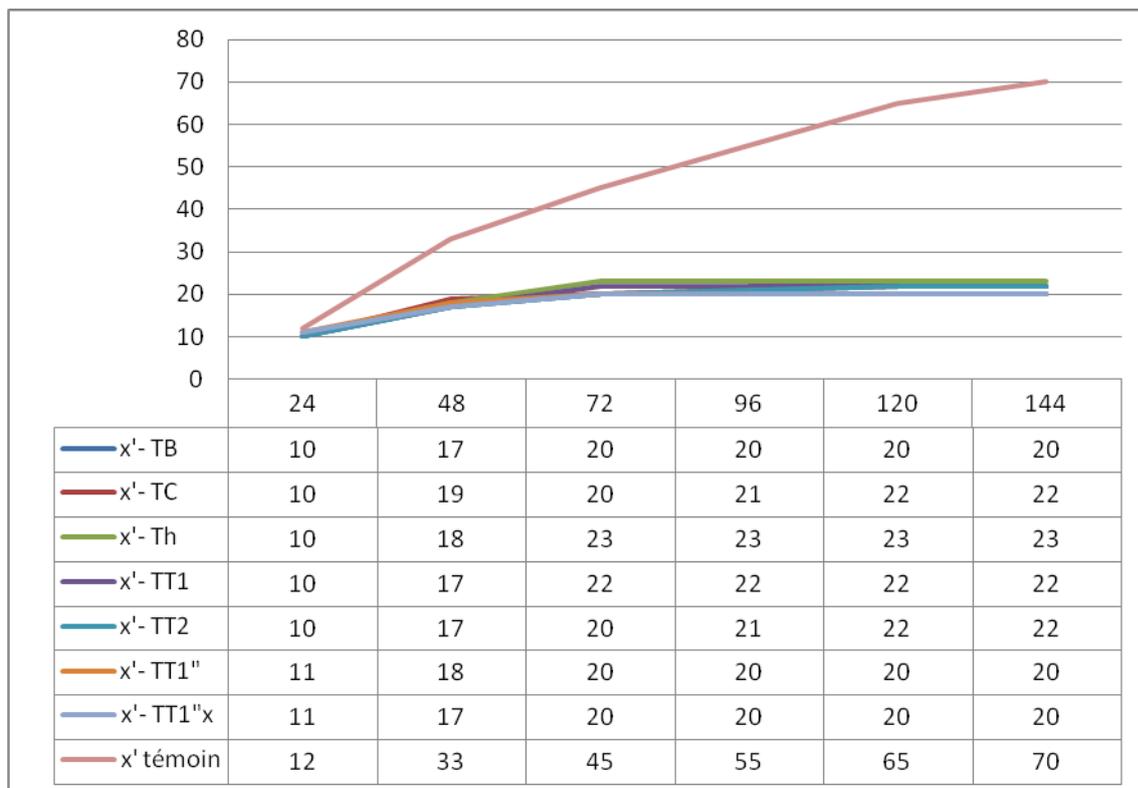
## Annex 3



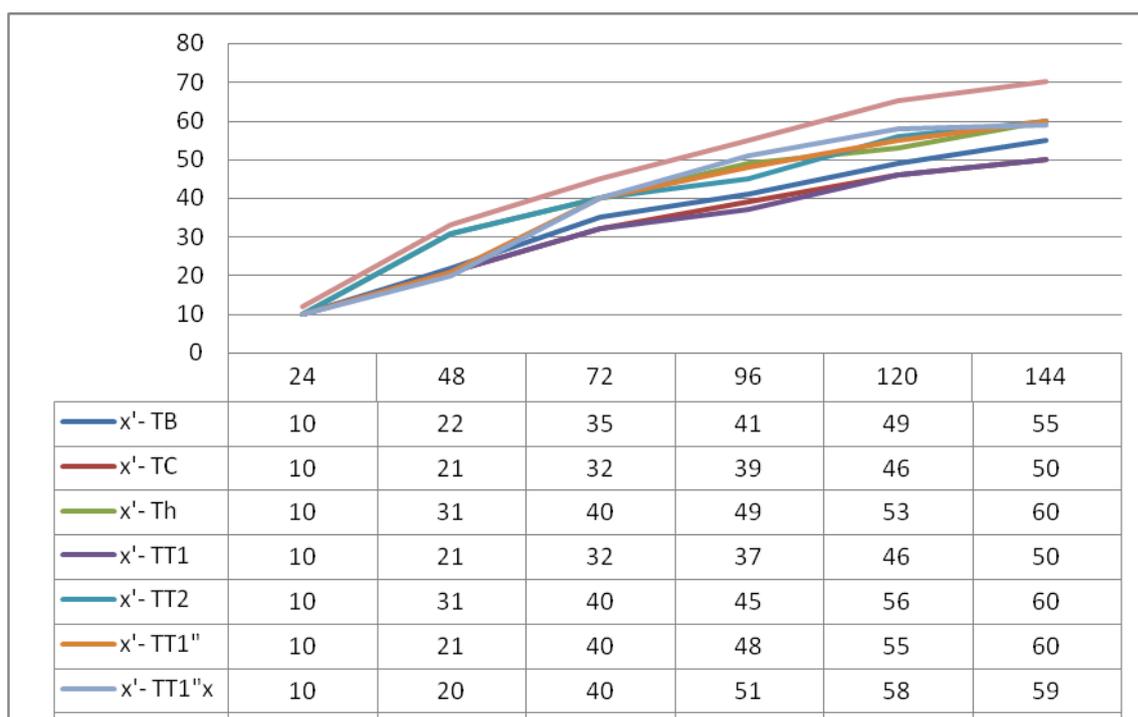
**Figure 40** cinétique de développement de la souche pathogène X sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



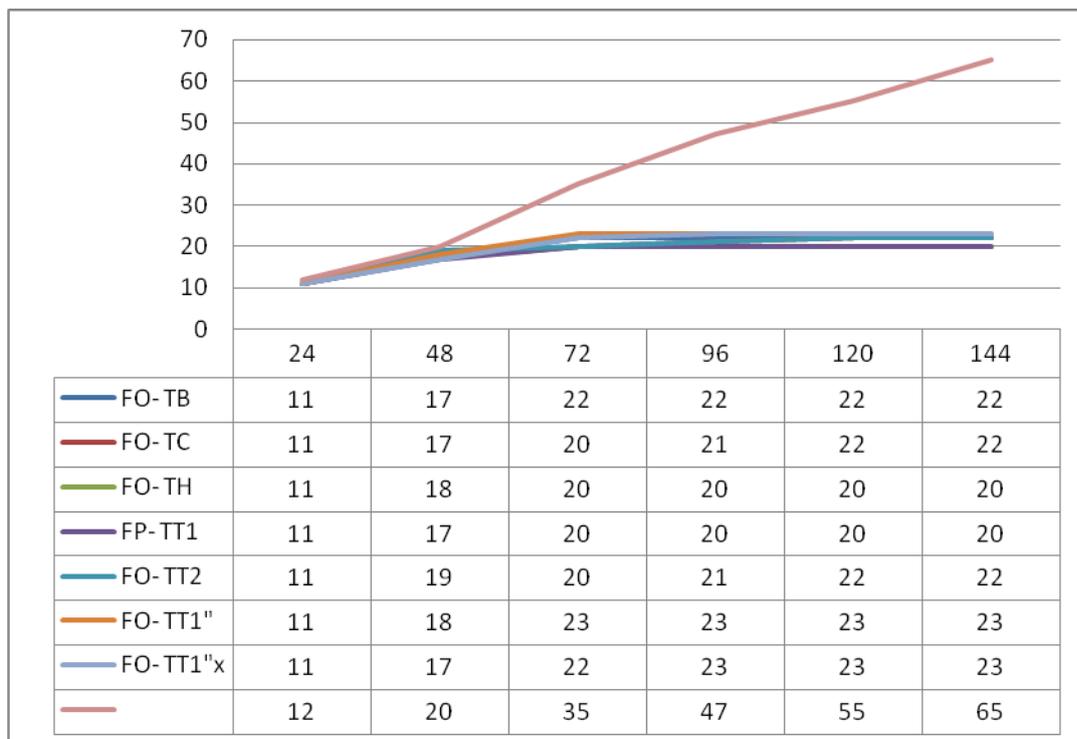
**Figure 41** cinétique de développement de la souche pathogène X sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



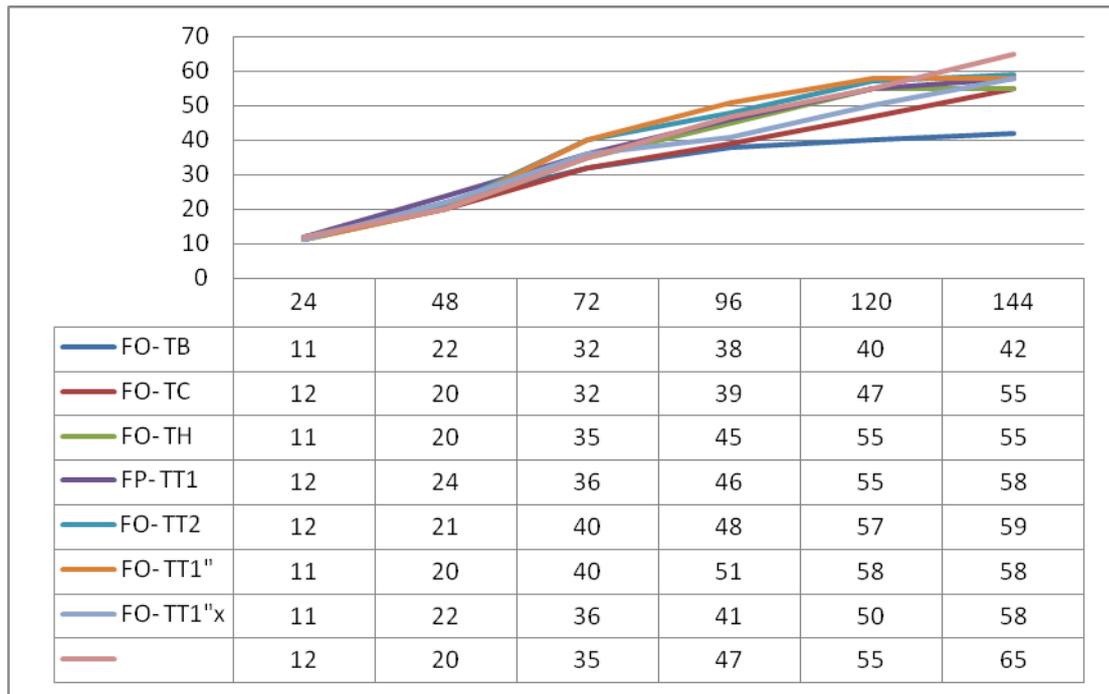
**Figure 42** cinétique de développement de la souche pathogène X' sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



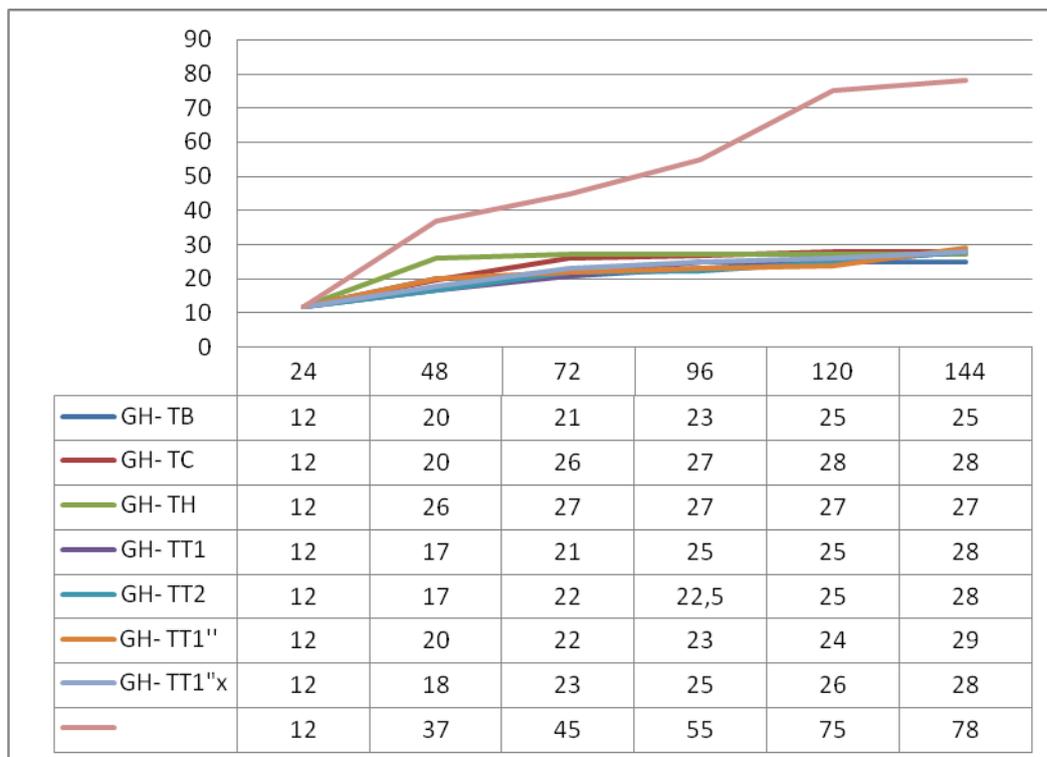
**Figure 43** cinétique de développement de la souche pathogène X' sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



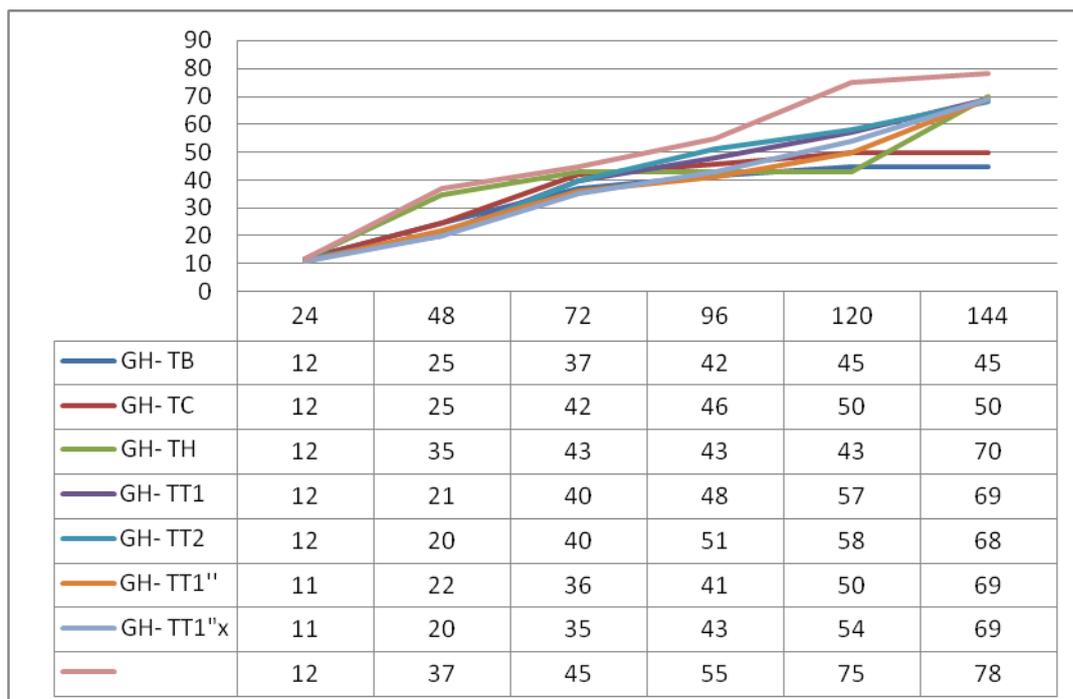
**Figure 44** cinétique de développement de la souche pathogène FO sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



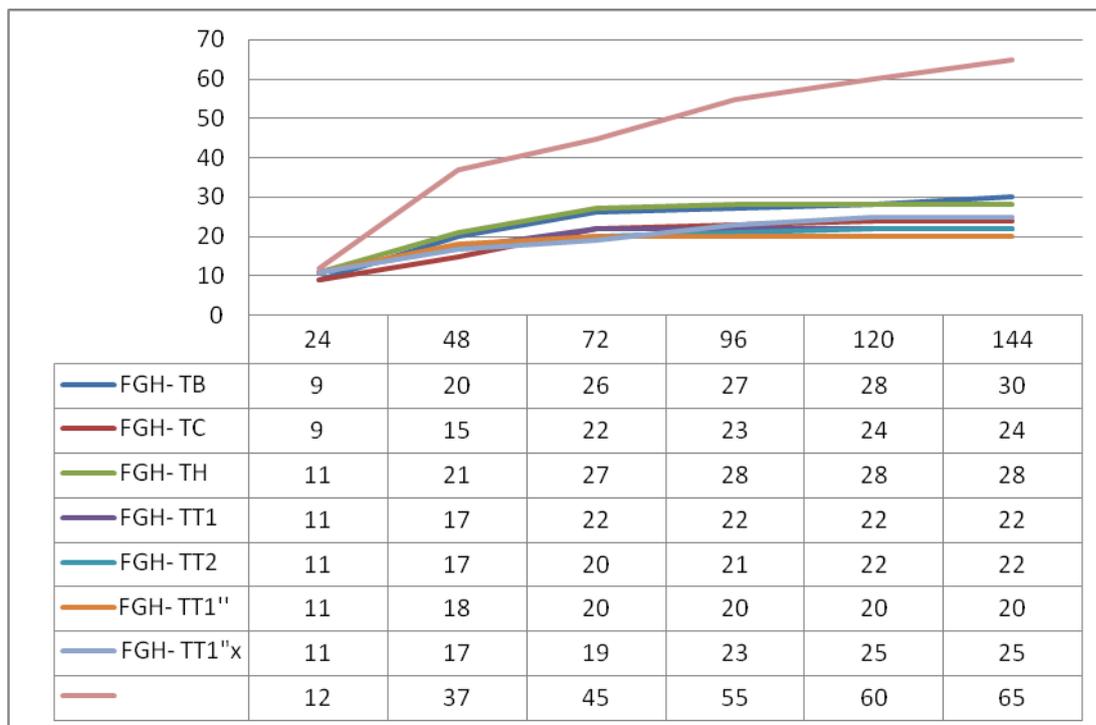
**Figure 45** cinétique de développement de la souche pathogène FO sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



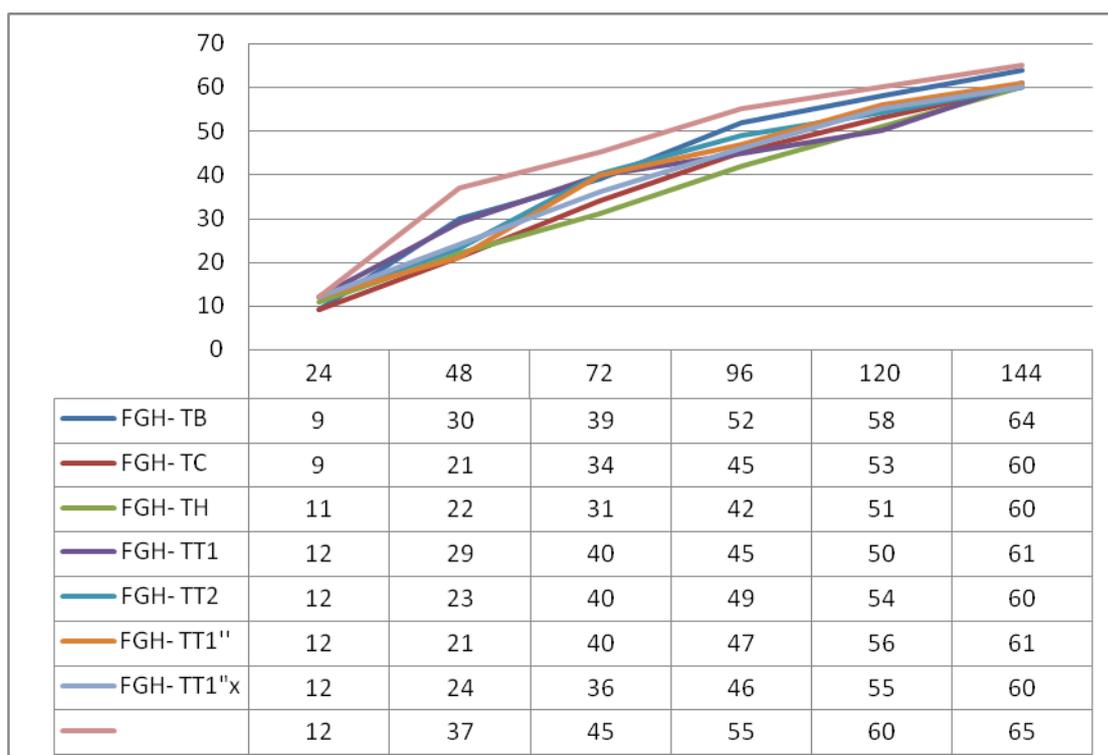
**Figure 46** cinétique de développement de la souche pathogène GH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



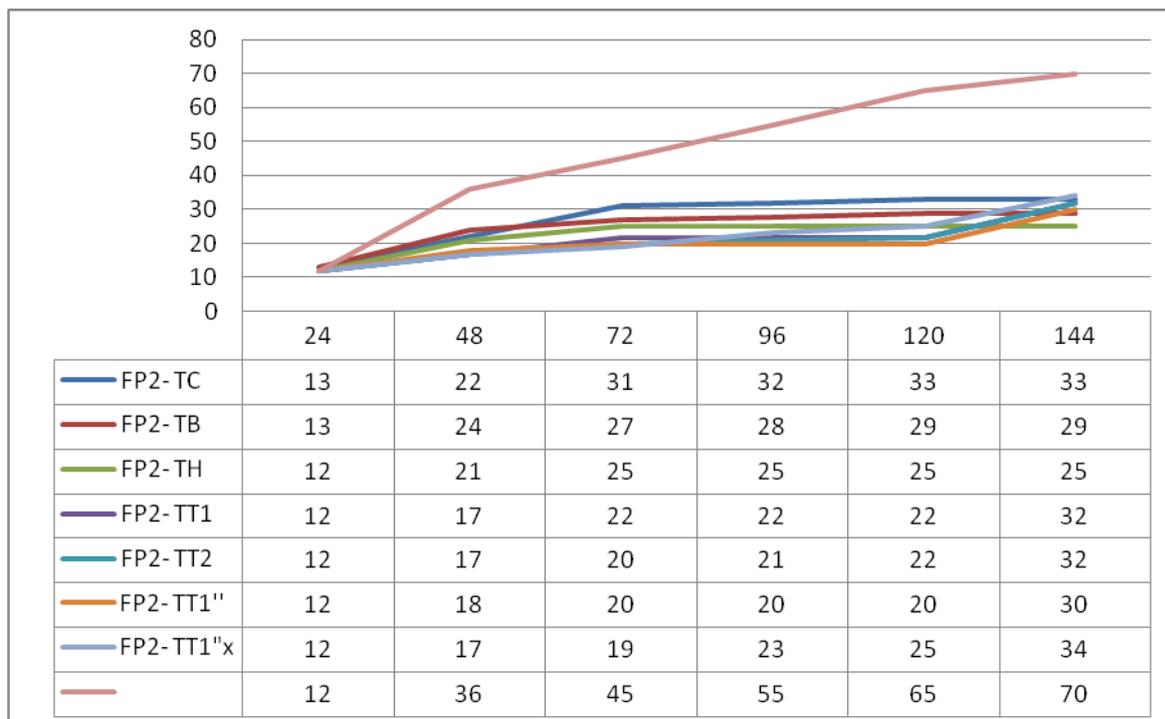
**Figure 47** cinétique de développement de la souche pathogène GH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



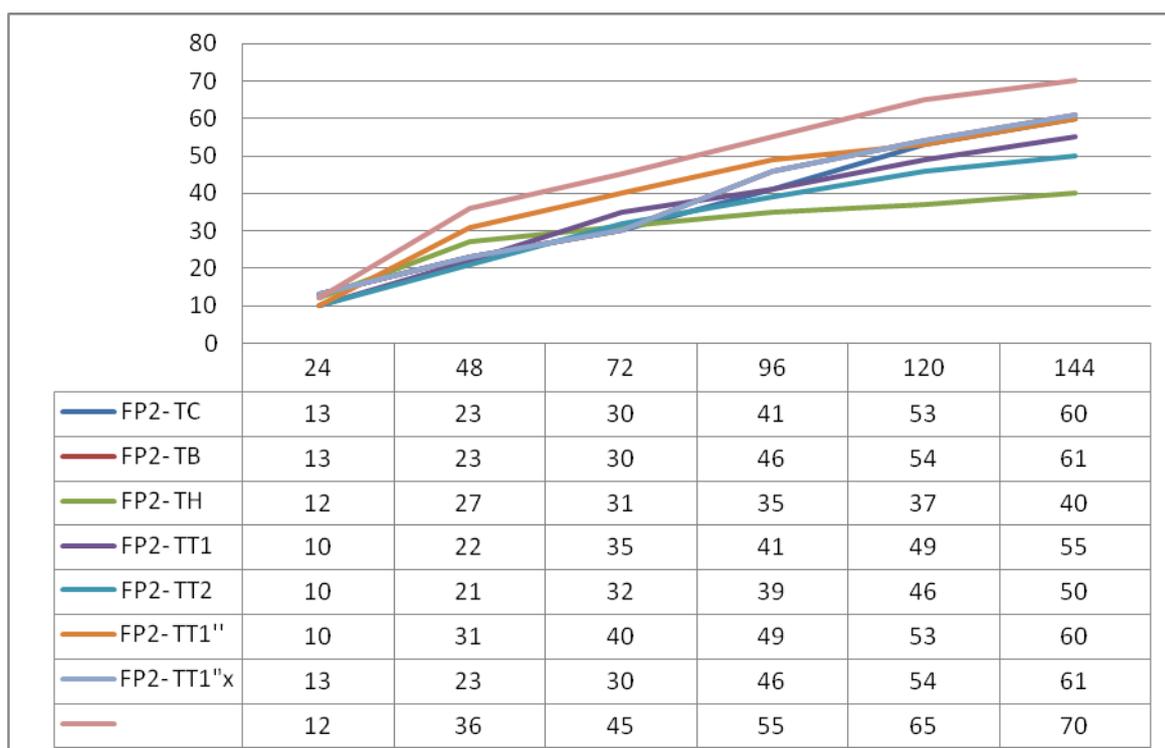
**Figure 48** cinétique de développement de la souche pathogène FGH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



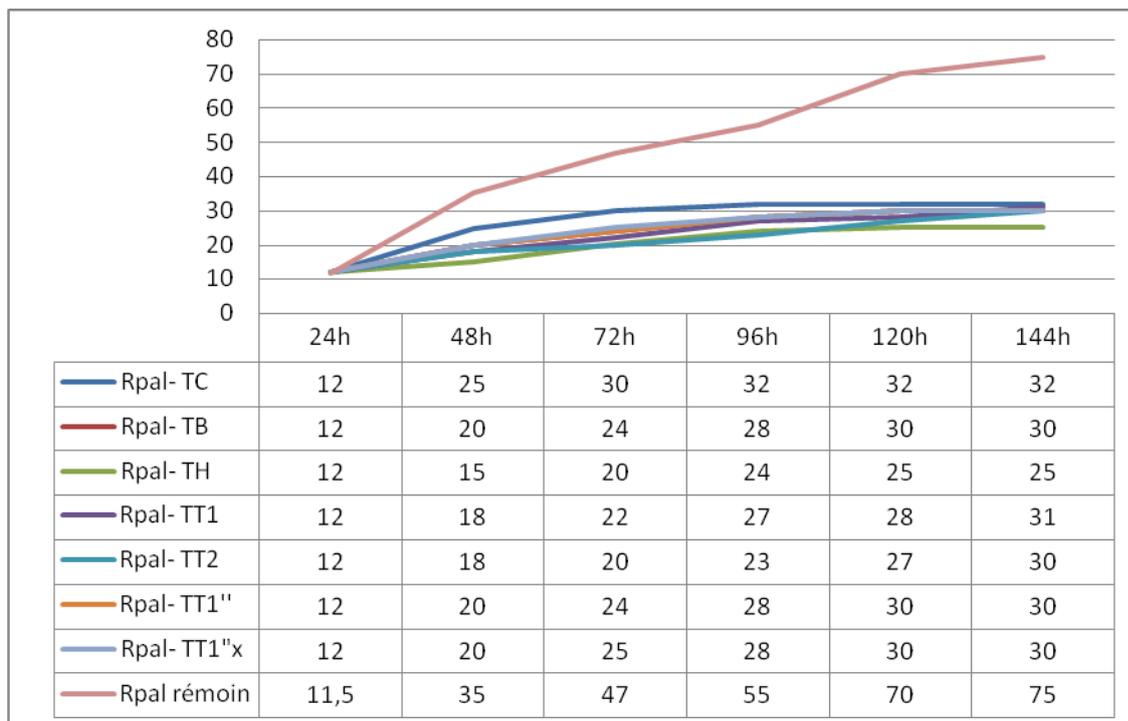
**Figure 49** cinétique de développement de la souche pathogène FGH sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



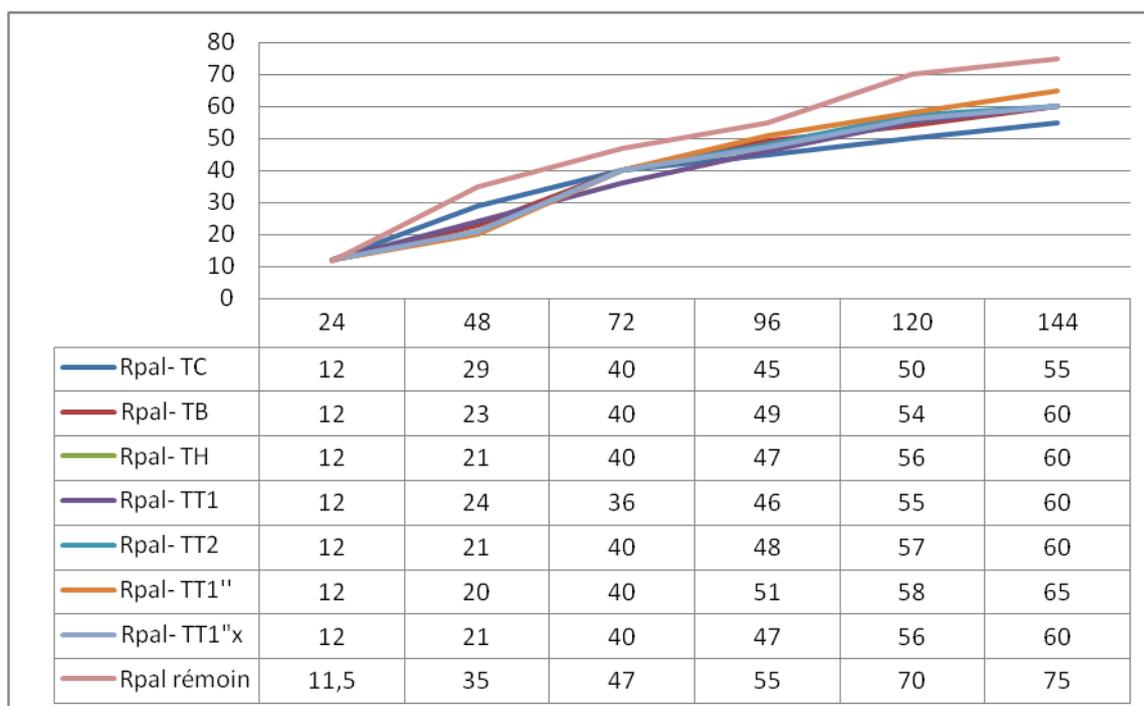
**Figure 50** cinétique de développement de la souche pathogène FP2 sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



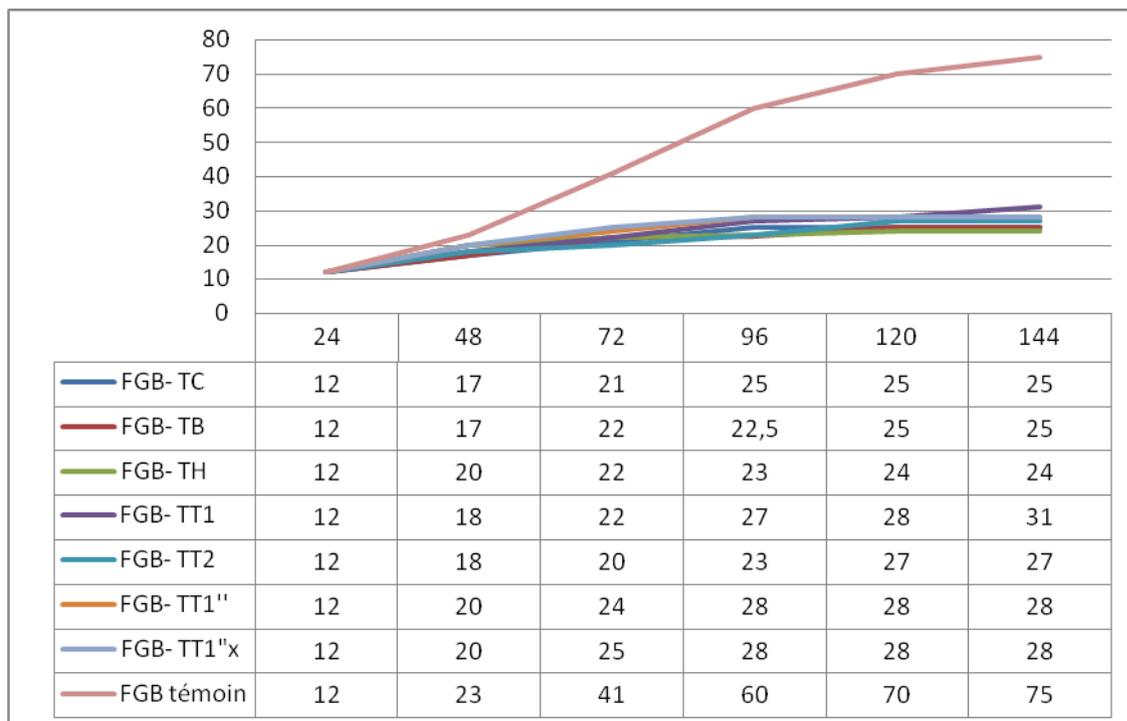
**Figure 51** cinétique de développement de la souche pathogène FP2 sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



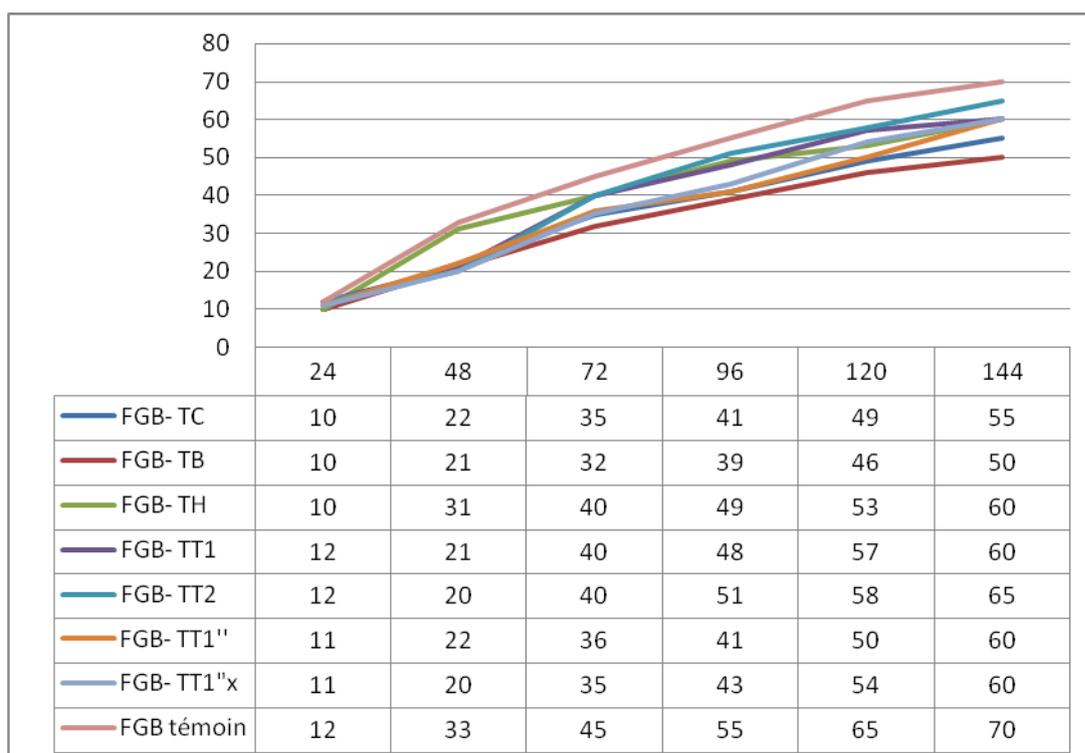
**Figure 52** cinétique de développement de la souche pathogène Rpal sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



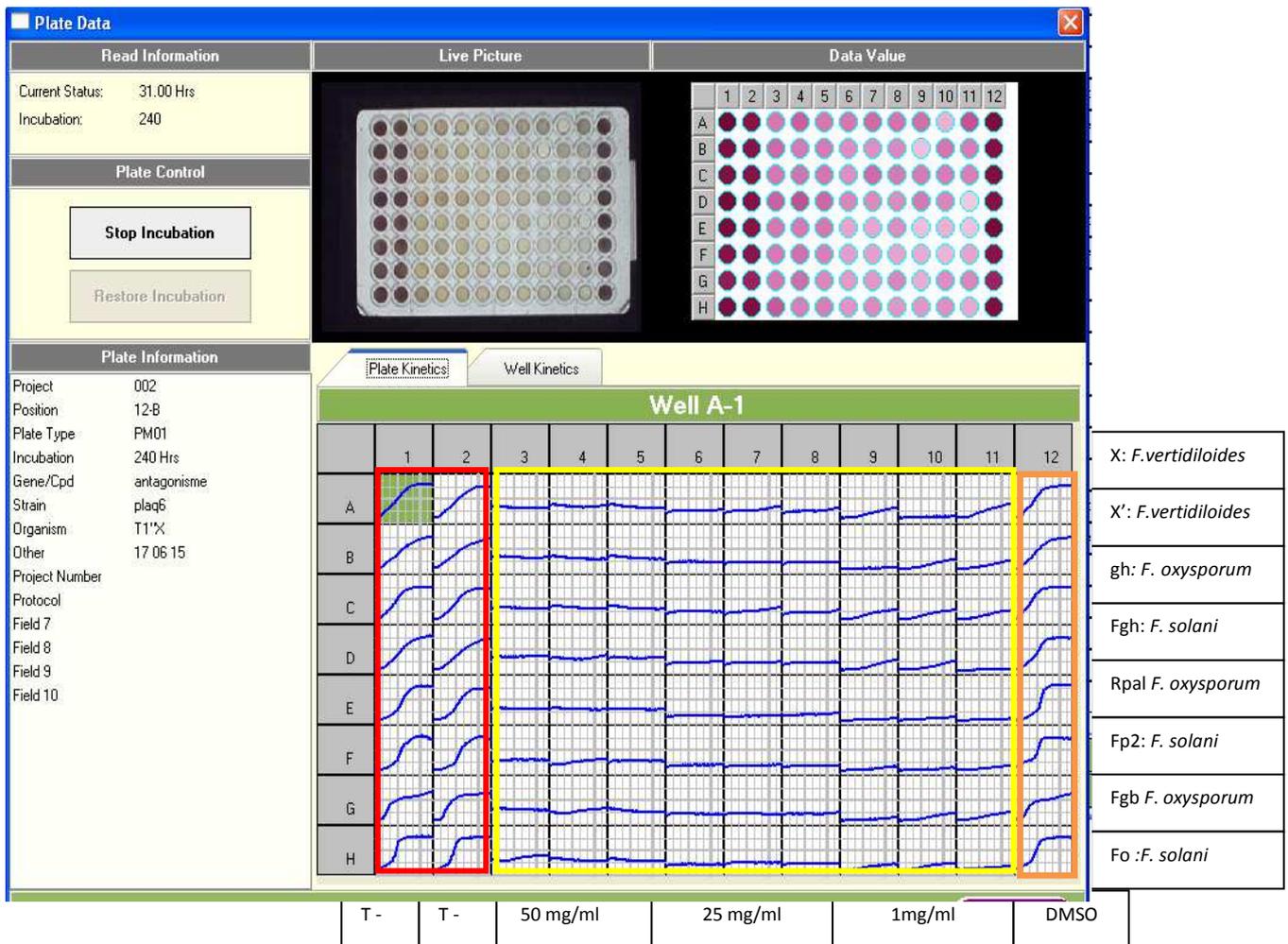
**Figure 53** cinétique de développement de la souche pathogène Rpla sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



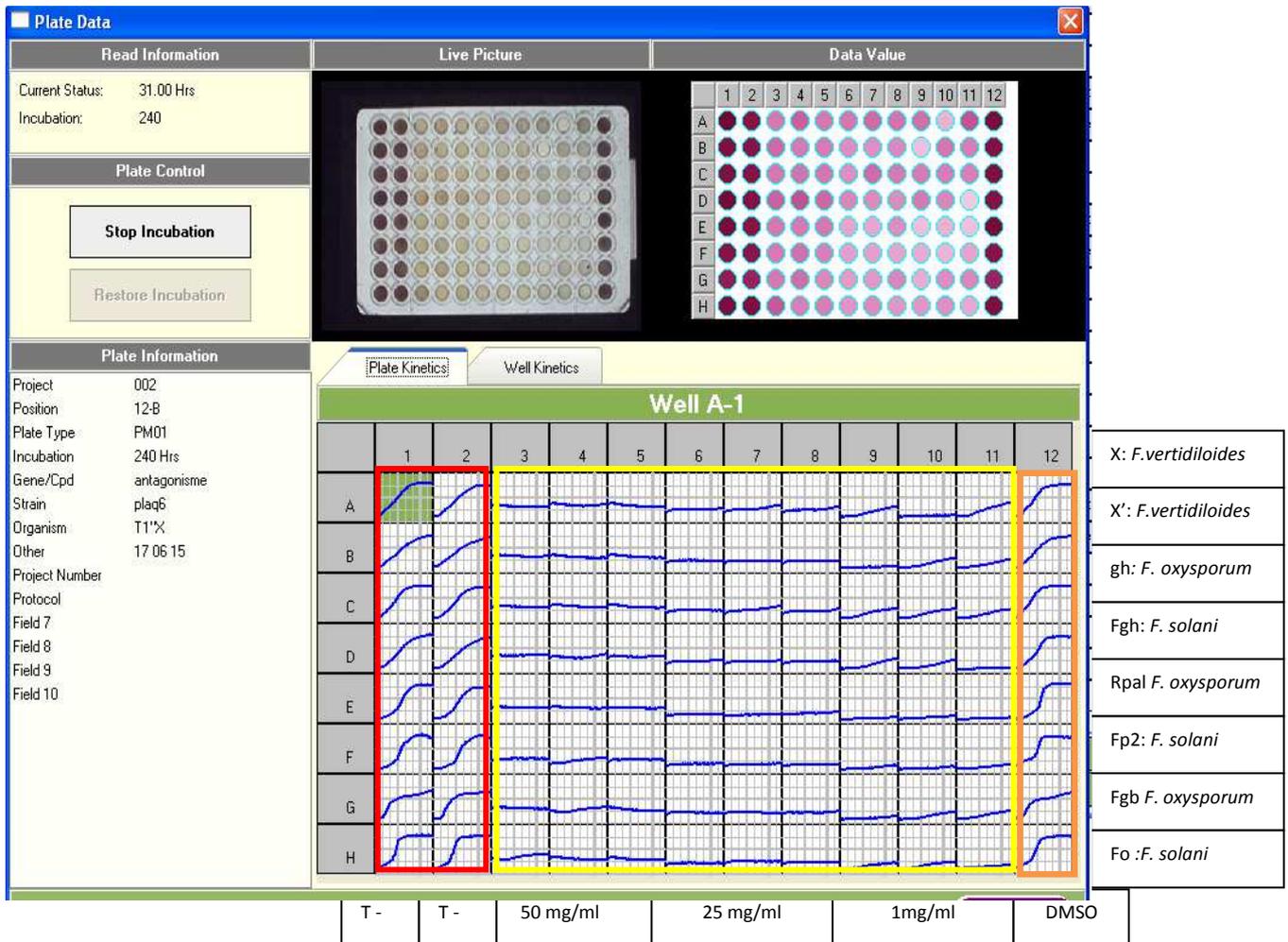
**Figure 54** cinétique de développement de la souche pathogène FGB sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation directe



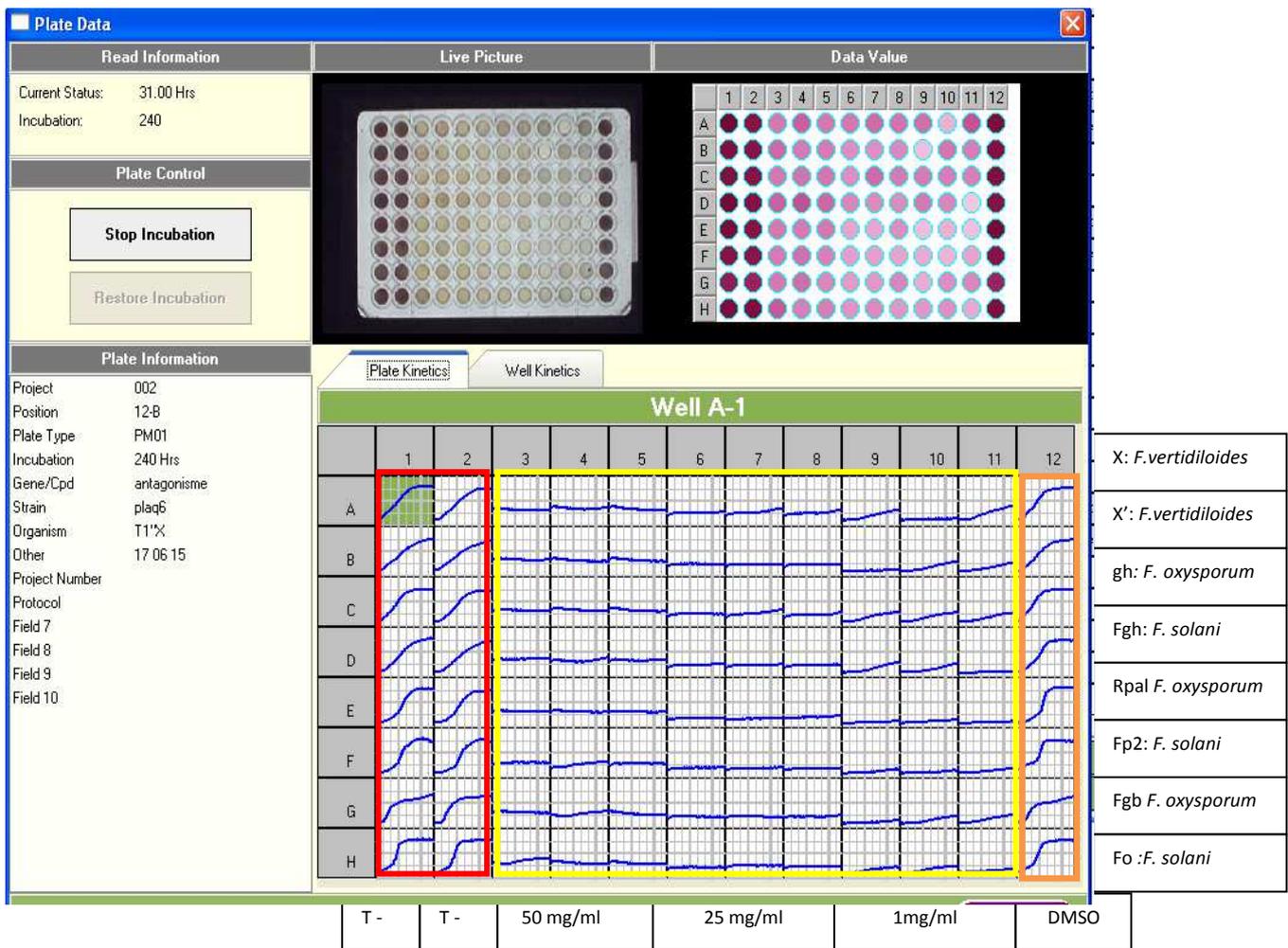
**Figure 55** cinétique de développement de la souche pathogène FGB sur milieu PDA pendant 6 jour, cultivé seul et avec les différent antagonistes par confrontation indirecte



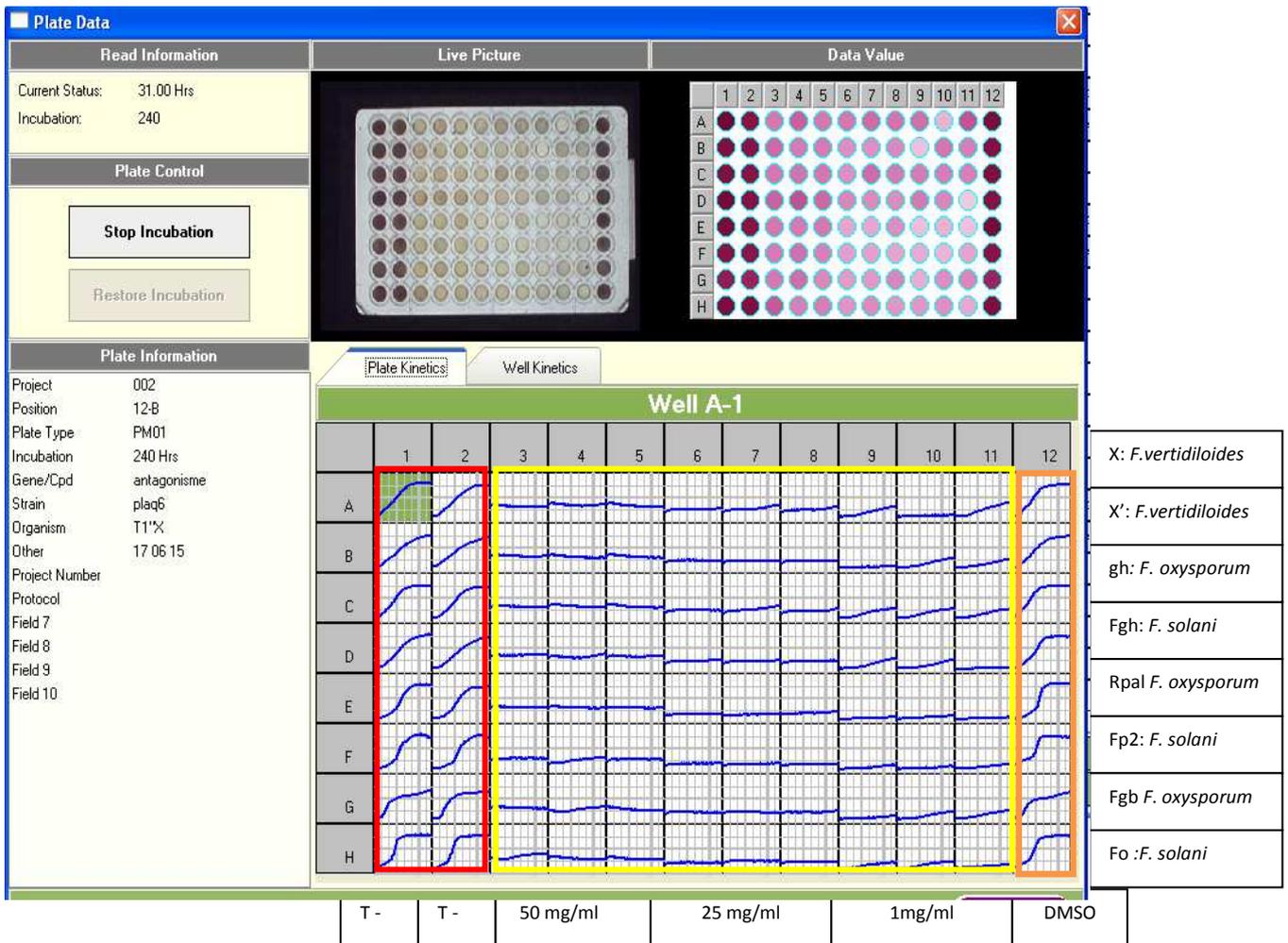
**Figure 56** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma harzianum* (TB) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A**: photo réelle de la plaque BIOLOG, **B**: Schématisation de la plaque BIOLOG, **C**: cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.



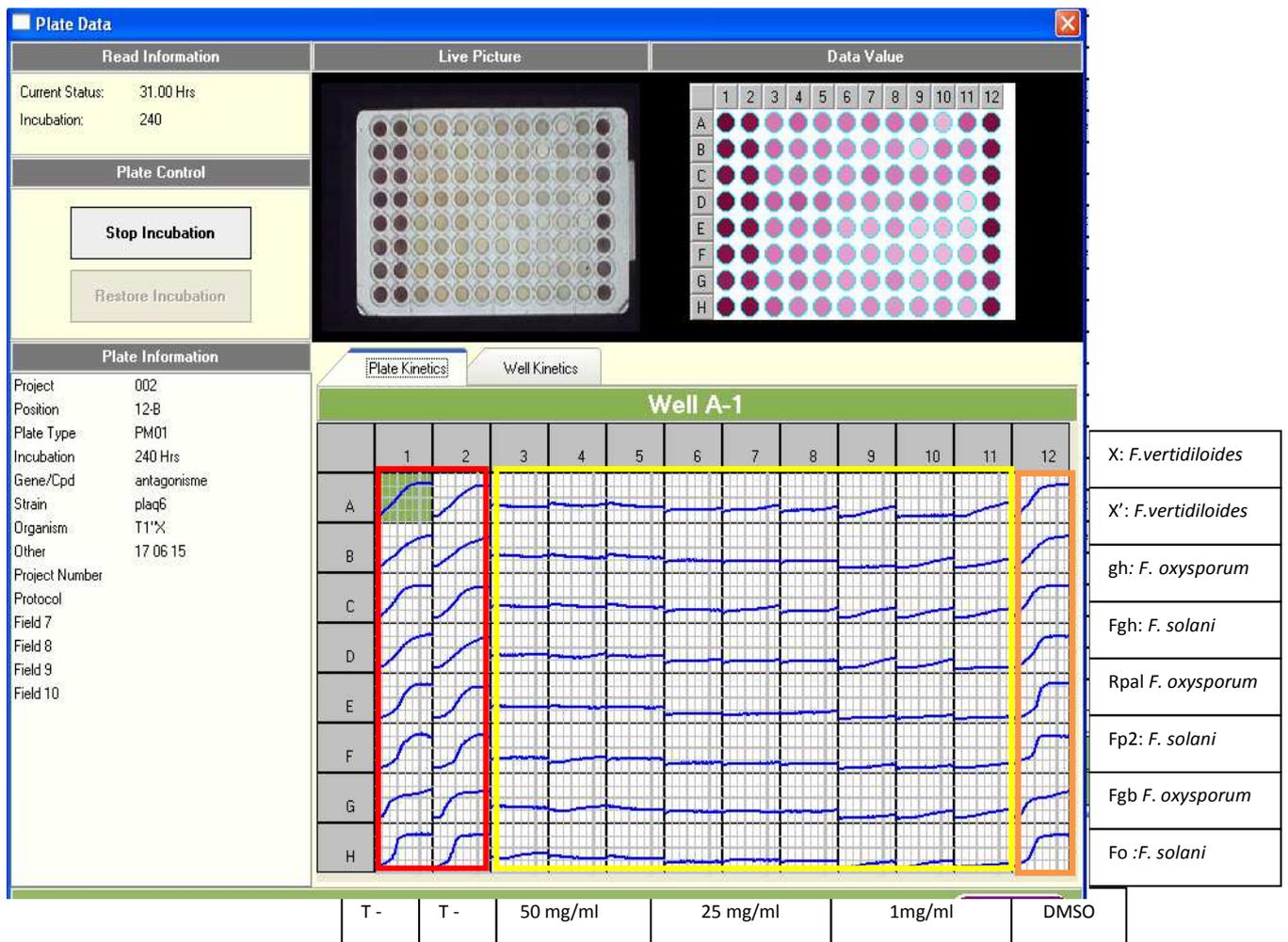
**Figure 57** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma virens* (Th) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.



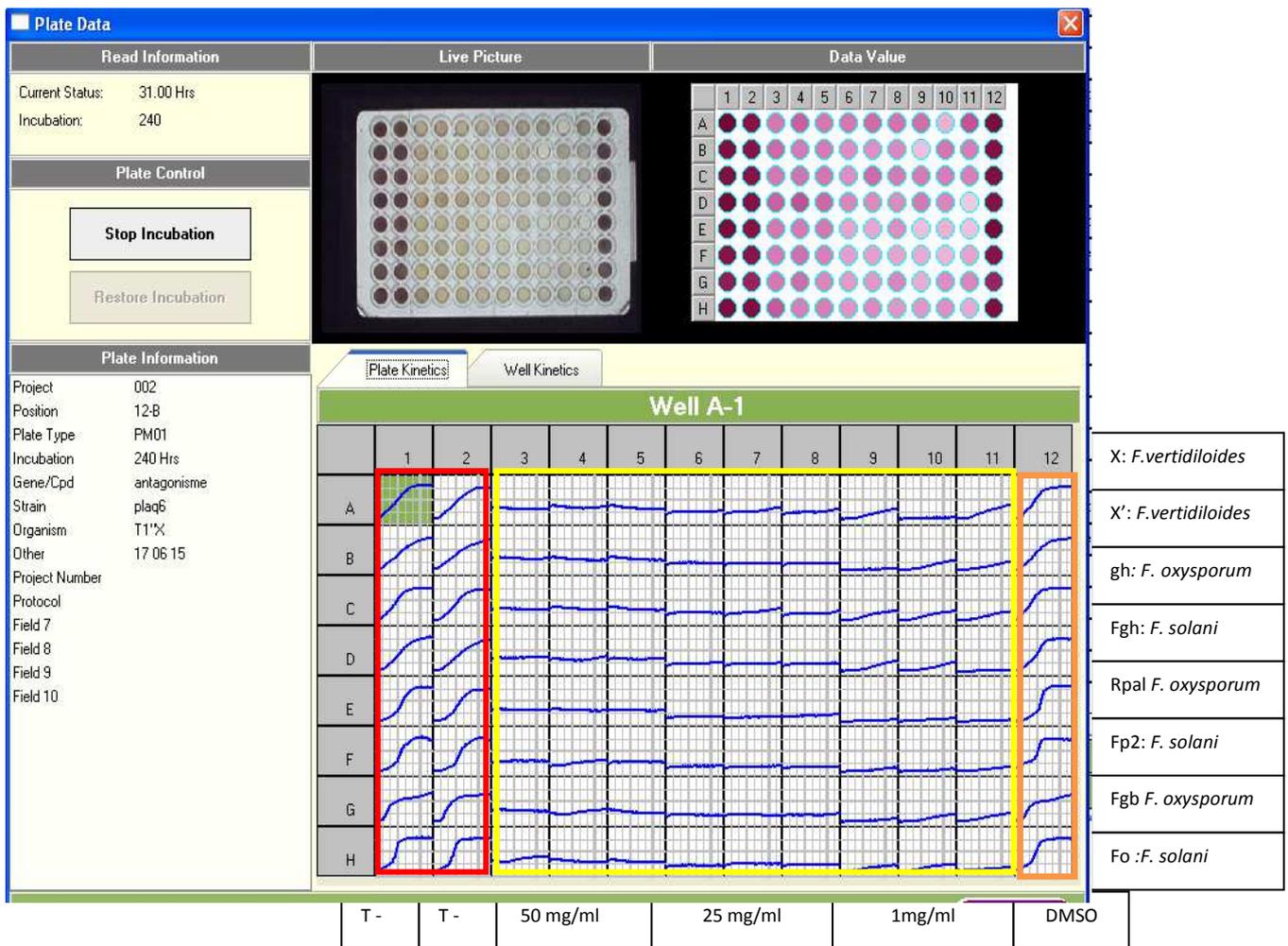
**Figure 58** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma longibrachiatum* (T1) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A**: photo réelle de la plaque BIOLOG, **B**: Schématisation de la plaque BIOLOG, **C**: cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.



**Figure 59** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma viride* (T1") sur les espèces de *Fusarium* testées. A: photo réelle de la plaque BIOLOG, B: Schématisation de la plaque BIOLOG, C: cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.



**Figure 60** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma longibrachiatum* (T1'x) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A:** photo réelle de la plaque BIOLOG, **B:** Schématisation de la plaque BIOLOG, **C:** cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.



**Figure 61** Effet de l'extrait chloroformique de *Trichoderma longibrachatum* (T2) sur les espèces de *Fusarium* testées. **A**: photo réelle de la plaque BIOLOG, **B**: Schématisation de la plaque BIOLOG, **C**: cinétique de développement des cellules fongiques des souches pathogènes.

Nom: GHORRI  
Prénom: Sana

Date de soutenance: le 12 / 10 / 2015

**Thème:** Isolement des microorganismes possédant une activité anti-*Fusarium*.

### Résumé:

La présente étude a pour le but de lutter contre le champignon phytopathogène "*Fusarium sp.*". Huit champignons du genre *Fusarium*, ont été isolés à partir de différents organes des plantes infectés. L'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques, alors que l'identification des espèces a été réalisée par voie moléculaire. En effet, d'après les résultats d'affiliation, les huit souches pathogènes appartiennent aux *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*.

La lutte biologique contre ces phytopathogènes, est mise en évidence en utilisant sept souches du genre *Trichoderma* isolées à partir de sols agricoles Algériens. L'identification moléculaire des isolats divise les 7 souches sur 5 principales espèces à savoir: *Trichoderma album*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*.

L'effet de l'activité antagoniste des souches de *Trichoderma* contre les huit espèces du *Fusarium* isolé, a été étudié selon les méthodes de confrontation directe et indirecte. Les résultats de la confrontation directe montrent un pourcentage d'inhibition varie de 55% à 72% selon les espèces pathogènes et antagonistes testées, alors que les résultats de la confrontation à distance montre des faibles pourcentages d'inhibition varient de 2% à 43%.

Les sept souches de *Trichoderma* testées, montrent une capacité considérable de résistance sur les milieux à différents pH allant de 2 jusqu'à 9. Le test de l'activité enzymatique des souches antagonistes, prouve que les sept souches testées représentent une source très importante des enzymes lytiques à savoir la chitinase, la cellulase, la protéase, la lipase et la laccase.

Le test de l'activité anti-*Fusarium*, des filtrats de cultures des souches antagonistes, montrent une faible inhibition de la croissance mycélienne de pathogène. De plus, il a été remarqué un changement de la couleur et de l'aspect des souches de *Fusarium* due aux métabolites des antagonistes testés.

L'effet de l'extrait chloroformique des sept souches antagonistes, a été testé par la technique de BIOLOG ainsi par la technique des disques imbibés, montrent une bonne activité inhibitrice des extraits, quelque soit la concentration utilisée (50 mg/ml, 25 mg/ml et 1mg/ml).

**Mots clé:** *Fusarium*, Fusariose, lutte biologique, *Trichoderma*, BIOLOG, extraits fongiques

**Laboratoire de recherche:** LaMyBAM, laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et de l'Activité microbienne, Université les frères Mentouri, Constantine, Algérie.  
Laboratoire de microbiologie et Biomolécules Actives (LMBA), Université El manar, Tunis, Tunisie.

Président : M<sup>r</sup> KACEM CHAOUACHE N. Professeur, Univ. frères mentouri Constantine

Directeur de thèse : M<sup>r</sup> DEHIMAT L. Professeur, Univ. frères mentouri Constantine

Examineurs : M<sup>me</sup> MIHOUBI I. Professeur, Univ. frères mentouri Constantine

M<sup>r</sup> SNOUCI M. Professeur, Université d'Oum el Bouaghi

M<sup>r</sup> GUECHI A. Professeur, Université de Sétif

M<sup>r</sup> YAHIA A. Professeur, Centre Universitaire Mila

Invité: M<sup>r</sup> OUFROUKH A. Docteur et Directeur, INRA Constantine

