

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2
Option : Biologie des Interactions Plantes-Microorganismes

Présenté par : **BOUKERCHAOUI Saliha**

**Evaluation de l'activité antagoniste des filtrats
de cultures d'un isolat de *Trichoderma sp.* Vis-
à-vis de quelques champignons
phytopathogènes**

Soutenu devant le jury :

BENCHABANE M.	Professeur	U. Blida 1	Président
AMMAD F.	M.C.B.	U. Blida 1	Promotrice
BOUCHENAK F.	M.C.B.	U. Blida 1	Examinatrice
YALA A.	Doctorante	U. Blida 1	Invitée

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016/2017

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de mycologie du département des Biotechnologies de l'Université de Blida1. Et au laboratoire de mycologie à l'institut national de la protection des végétaux d'El Harrach (INPV).

Je remercie, en premier lieu, ALLAH le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.

Au terme de ce travail, Je tiens à exprimer toute ma gratitude, ma reconnaissance et mes sincères remerciements à ma promotrice **M^{me} Ammad F.** d'avoir accepté de m'encadrer, diriger et donné la chance de travailler ce sujet, sa confiance, sa disponibilité et la générosité qu'elle a m'ont accordée pour faire avancer ce travail.

Je remercie sincèrement **Pr. BENCHABANE M** de m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de mon travail.

Je remercie également à **M^{lle} BOUCHENAK f.** et **M^{lle} YALA A.** d'avoir accordé leurs temps pour honneur d'évaluer et d'enrichir ce travail.

Je remercie très vivement, **M^{me} C. Zouai, M^{lle} Ousaaïd Yamina** de service mycologie /INPV de m'avoir permis de réaliser une partie de mon travail, la préparation des extraits de filtrat de culture et m'a aidé à réaliser l'extraction des métabolites secondaires au niveau de laboratoire des pesticides. Mes remerciements vont aussi à, **M^{lle} khalida, M^{lle} Hadjer** et a toutes les personnes de l'INPV pour leurs aides et disponibilités pour répondre à mes questions durant cette recherche.

A **M^{me} AIT SAIDI N.**, de m'avoir fait profiter des connaissances et pour le soutien et conseils qu'elle m'a accordé concernant l'analyse enzymatique.

Un grand merci également à **FADIL Djamila**, ingénieur du laboratoire, pour sa disponibilité et ses encouragements durant toute l'expérimentation.

Je remercier très spécialement **Mr Izri Hamza**, qui a été toujours là pour moi, pour sa grande part dans la réalisation de cette recherche et pour ces conseils sérieux, Merci pour votre amitié.

Je tiens a remercié **Mr Souaber Mohamed**, pour son aide et son support moral et encouragement tout au long de ma démarche.

J'adresse mes plus sincères remerciements a tout ma famille pour leurs encouragements et surtout **Mohamed Reda, Ikram** et **saada**.

Enfin, que tous ceux, de près ou de loin, dont l'assistance ou les conseils m'ont permis de mener à bien ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et de mes salutations les plus respectueuses.

Dédicaces

À cœur vaillant rien d'impossible À conscience tranquille tout est accessible Quand il y a la soif d'apprendre Tout devient facile pour arriver à nos fins Malgré les obstacles qui s'opposent En dépit des difficultés qui s'interposent Les études sont avant tout Notre unique et seul atout Ils représentent la lumière de notre existence

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

A mon père que nulle dédicace ne puisse exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour l'encouragement contenu les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A ma très chère Maman, et ma deuxième mère Saada, merci pour ton amour, ton inquiet, tes encouragements et ton soutien durant toute ma vie, je t'aime énormément.

À mes très chères sœurs Fatima El zahraa, Khoulod, Ikram et mes Cher frères Riadh et Yahia, à qui je dois tout l'amour, avec tous mes vœux de les voir réussir dans leurs vies.

A mes amies, mes collègues de la promotion, à qui je souhaite le succès, pour l'amitié qui nous a toujours unis, qui sans leur encouragement ce travail n'aura jamais vu le jour.

A tous ceux qui m'ont encouragé, soutenus et supporté pour que ce travail puisse s'accomplir

Liste des abréviations

BDA	Black Dead Arm .
°C	Degré Celsius.
µl	Microlitre.
AIA	Aide indole acétique.
BD	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
FNRDA	Fond National de régulation et développement agricole).
FTIR	Fourier Transformed Infra Red spectroscopy
g	gramme.
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse liée à la spectrométrie en mass .
GLM	Generalized –linear Model.
ml	Millilitre .
O.I.V	Organisation international de vine.
P.N.D.A.	Le plan national de développement Agricole
PDA	Potato Dextrose Agar.
PDB	Potato Dextrose Broth.
PGPF	Plant Growth Promoting Fungi.
rpm	rotation par minute.
Tsp	<i>Trichoderma sp.</i>

Listes des Annexes

Annexe 1	Milieux de culture utilisés	110
Annexe 2	Spectres obtenues par l'analyse FTIR de <i>Trichoderma sp</i>	112
Annexe 3	les moyennes des nécroses calculer sur les variétés testées en cm	50

Liste des Figures

Figure 1	Les symptômes au niveau du bois de <i>Vitis vinifera</i> atteintes d'eutypiose, (a) et (b) rameaux rabougris. (c) nécrose brune en forme de V (Bertsch et <i>al.</i> , 2013).	7
Figure 2	Les symptômes au niveau du bois et des feuilles de <i>Vitis vinifera</i> atteintes d'esca (Bertsch et <i>al.</i> , 2013).	8
Figure 3	Les symptômes au niveau du bois et des feuilles de <i>Vitis vinifera</i> de Black Dead Arm également appelé chancre à <i>Botryosphaeria</i> ,	11
Figure 4	Les cinq sections de <i>Trichoderma</i> reconnus par Bissett (1991).	19
Figure 5	Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de <i>Trichoderma</i> (Irina et <i>al.</i> , 2011).	24
Figure 6	Mécanisme de mycoparasitisme des <i>Trichoderma</i> (Druzhinina et <i>al.</i> , 2011)	26
Figure 7	Schéma montrant la confrontation à équidistance du l'agent pathogène et de <i>Trichoderma sp.</i> sur milieu PDA	33
Figure 8	Schéma montrant la confrontation à distance	34
Figure 9	Méthodologie de l'inoculation des mycéliums pathogène ou de pathogène et l'antagonistes.	36
Figure 10	Ré-isolement des souches pathogènes sur milieu PDA.	38
Figure 11	Aspect macroscopique et microscopique de <i>Trichoderma sp.</i> ,	40
Figure 12	Aspect macroscopique et microscopique des <i>Botryosphaeriaceae</i> .	41
Figure 13	Production de la chitinase par <i>Trichoderma sp.</i>	43
Figure 14	Production d'endoglucanase après 7 jours d'incubation à 28°C.	44

Figure 15	Production des amylases par <i>Trichoderma</i> après 3 jours d'incubation à 28°C .	44
Figure 16	Formation d'un halo brun-foncé autour des colonies de <i>Trichoderma</i> caractéristique de la production de ligninase après 2 jours d'incubation.	45
Figure 17	Production de la lipase traduite par la présence d'un halo blanc opaque autour de colonie de <i>Trichoderma</i> .	45
Figure 18	Apparition d'un Halo transparent autour de la colonie de <i>Trichoderma sp.</i>	46
Figure 19	Production d'AIA sur le milieu liquide additionné de tryptophane.	46
Figure 20	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des <i>Botryosphaeria</i> par <i>Trichoderma sp</i> après six jours d'incubation à 25 °C	53
Figure 21	Inhibition de la croissance mycélienne des <i>Botryosphearia</i> (B), en comparaison avec leur témoin(A), par confrontation directe avec <i>Trichoderma sp.</i> Après 6 jours d'incubation à 25°C.	54
Figure 22	Action mycoparasitaire de l'isolat <i>Trichoderma sp</i> montrant une surcroissance et une sporulation abondante sur la colonie de pathogène.	55
Figure 23	Sporulation de <i>Trichoderma sp</i> en masse sur les hyphes de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (x40)	55
Figure 24	Apparition de grandes vacuoles à l'intérieur du mycélium de pathogène (x40)	56
Figure 25	la lyse Présence de petites vésicules de <i>Botryosphaeria sp2</i> (x40)	56
Figure 26	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria</i> par <i>Trichoderma sp</i> après six jours d'incubation à 25 °C	57
Figure 27	Pourcentage d'inhibition de mycélium des pathogènes par le filtrat de culture de <i>Trichoderma</i> après 5jours d'incubation	58
Figure 28	Pouvoir inhibiteur de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> sur le mycélium des pathogènes après 5 jours d'incubation à 25 °C.	59

Figure 29	Des nécroses internes et des chancres sur la variété Datale	68
Figure 30	Evolution des tailles des nécroses des boutures inoculées par le pathogène	68
Figure 31	Evolution des tailles des nécroses des boutures inoculées par le pathogène et traités par <i>Trichoderma sp.</i>	69
Figure 32	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Victoria). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	70
Figure 33	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Red glob). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	70
Figure 34	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Muscat italia). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	71
Figure 35	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Datale). <i>Chapitre III Résultats et discussion</i> (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	71
Figure 36	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Cardinal). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	72
Figure 37	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Alphonse lavallé). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	72
Figure 38	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (porte-greffe 1103P). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma sp</i> et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	73

Figure 39	Disparition total des lésions sur port-greffe 1103P	73
Figure 40	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (variété Debouki). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma</i> sp et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	74
Figure 41	Les nécroses présentées sur les boutures de <i>Vitis vinifera</i> (bouture SO4). (A, C, E, G) : inoculé par <i>Botryosphaeria dothidea</i> (B, D, F, H) : co-inoculation de <i>Trichoderma</i> sp et <i>Botryosphaeria dothidea</i> au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).	74
Figure 42	Les longueurs des lésions provoquées sur les boutures traitées, variétés (a), agents fongiques (b) et (c) temps. LL : longueur des lésions.	76
Figure 43	Test post Hoc pour le facteur temps sur la variation de la taille des lésions provoquées sur bouture de vigne	77
Figure 44	Test post Hoc pour le facteur traitement sur la variation de la taille des lésions provoquées sur bouture de vigne	78
Figure 45	Test post Hoc pour le facteur variété sur la variation de la taille des lésions provoquées sur bouture de vigne	78
Figure 46	Le ré-isolement des agents fongiques sur DEBOUKI : inoculé par <i>Tsp</i> et <i>BD</i> , (a) :3jours, (b) :4jours, (c) :6jours	79
Figure 47	le ré-isolement des agents fongiques : inoculé par <i>BD</i> , (a) :3jours, (b) :6jours	79
Figure 48	Le ré-isolement des buchettes de port-greffe inoculer simultanément par le pathogène et l'antagoniste :(a,b :au milieu, 3jours ,6 jours c ;extrimité ,3jours) .	80
Figure 49	Le ré-isolement des buchettes de port-greffe inoculer par le pathogène :(a :3jours , b :6 jours d'incubation).	80
Figure 50	Apparition des racine sur alphonse lavallé(a) et Red glob (b)après deux semaine d'inoculation avec l'antagoniste	82

Listes des Tableaux

Tableau 1	Situation sur l'évolution de la viticulture en Algérie (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, 2014)	05
Tableau 2	Caractéristiques des souches fongiques	28
Tableau 3	Différentes caractéristiques des cépages	28
Tableau 4	Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> de la phase aqueuse.	49
Tableau 5	Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> de la phase organique.	50
Tableau 6	Longueur des nécroses sur des boutures de vigne après 4 semaines d'inoculation par les agents fongiques	75
Tableau 7	La longueur des tiges et racines par rapport aux traitements et aux variétés.	82

Evaluation de l'activité antagoniste des filtrats de cultures d'un isolat de *Trichoderma* sp. Vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes

Résumé

Les maladies du bois sont très dommageables sur la culture de la vigne à travers le monde. Parmi les principales maladies impliquées dans le dépérissement le Black Dead Arm(BDA), considéré comme un pathosystème complexe nécessitant la mise au point de solution alternative s'appuyant sur le rôle des microorganismes antagonistes comme agent naturels dans la stimulation de la défense naturelle des plantes. Notre travail porte sur la caractérisation enzymatique de *Trichoderma* sp, cette souche a montré sa capacité de produire des métabolites secondaires volatils et non volatils, des phytohormones (AIA) et des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire du pathogène (chitinase, cellulase, protéases et lipases). Les résultats de cette étude ont montré que : l'application *in vitro* de *Trichoderma* vis-à-vis les agents pathogènes appartenant au genre *Botryosphaeria* sp. agents causal de dépérissement du bois de vigne a montré une activité antagoniste importante par confrontation directe ou indirect, et par le filtrat de culture où il a inhibé significativement la croissance mycélienne de tous les agents pathogènes testés avec un pourcentage d'inhibition variable (19% à 62% par rapport aux témoins). Des observations microscopiques au niveau de la zone de contact ont montré un hyperparatisisme, une vacuolisation et une lyse des hyphes du pathogène. Cette étude a révélé l'aptitude de *Trichoderma* à agir par antibiose contre les *Botryosphaeriaceae* en libérant des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne. Les résultats du test de pathogénicité des boutures de vigne *in situ* ont permis l'apparition des lésions au bout de quelques temps, les lésions les plus importante ont été enregistré sur la variété Datale, suivi par Muscat d'Italie, alors que des faibles lésions ont été noté sur les porte greffe. Une réduction remarquable des nécroses causées par *Botryosphaeria dothidea* et traité par *Trichoderma spp* sur les mêmes variétés Datale et Muscat d'Italie et les deux portes greffe a été enregistré. *Trichoderma* sp a montré aussi un effet important sur la stimulation de la longueur des racines de quelques variétés. La longueur des racines de Victoria a atteint 9cm et celle de Muscat d'Italie a atteint 8,9cm. Afin d'identifier la nature de substances actives de l'antagoniste testé, une analyse chimique a été mené par la méthode FTIR et elle a révélé 25 groupes chimique fonctionnels par la dominance des Acides, des Alcane, des Alcools et phénols, groupement aromatiques, des acides carboxyliques, des amides et des lactames.

Mots-clés : Activité antagoniste, *Botryosphaeria* sp., enzymes hydrolytiques, FTIR. *Trichoderma* sp.

Evaluation of the antagonistic activity of the culture filtrates of an isolate of *Trichoderma* sp. against some phytopathogenic fungi

Abstract

wood diseases are very damaging on the vine culture throughout the world. Among the major diseases involved in the dieback is the Black Dead Arm (BDA), which is considered as a complex pathosystem requiring the development of an alternative solution based on the role of antagonist microorganisms as natural elicitors in stimulating the natural defense of plants. Our work focuses on the enzymatic characterization of *Trichoderma* sp, which has shown its ability to produce volatile and nonvolatile secondary metabolites, phytohormones (AIA) and enzymes that degrade the cell wall of the pathogen (chitinase, cellulase, proteases and lipases)

The results of this study showed that: the in vitro application of *Trichoderma* against the pathogens of the genus *Botryosphaeria* sp. causal agents of dieback of vine wood showed significant antagonistic activity by direct or indirect confrontation and by the culture filtrate where it significantly inhibited the mycelial growth of all the pathogens tested with a variable inhibition percentage (19% to 62% compared to controls). Microscopic observations near the contact zone showed hyperparatism, vacuolation and lysis of hyphae of the pathogen

This study revealed the ability of *Trichoderma* to act by antibiosis against Botryosphaeriaceae by releasing volatile and non-volatile active substances on mycelial growth. The results of the pathogenicity test of vine cuttings in situ allowed the appearance of the lesions after an amount of time, the most important lesions were recorded on the Datale variety, followed by Muscat of Italy, while weak lesions were noted on the transplant

A remarkable reduction of the necroses caused by *Botryosphaeria dothidea* and treated by *Trichoderma spp* on the same varieties Datale and Muscat of Italy and the two transplant was recorded. *Trichoderma sp* also showed an important effect on the stimulation of root length of some varieties. The length of the roots of Victoria reached 9cm and that of Muscat of Italy reached 8.9cm. In order to identify the active substance of the antagonist tested, a chemical analysis was carried out by the FTIR method and revealed 25 chemical groups functional by the dominance of the Acids, Alcanes, Alcohols and phenols, aromatic group, carboxylic acids, amides and lactams.

Keywords: Antagonistic activity, *Botryosphaeria* sp., Hydrolytic enzymes, FTIR. *Trichoderma* sp.

تقييم النشاط العدائي لمستخلصات لعزلة *Trichoderma sp* ضد بعض مسببات الأمراض الفطرية

ملخص

أن أمراض خشب الكرمة مضره جدا في جميع أنحاء العالم. ومن بين الأمراض الرئيسية ضد فطريات الموت الغير الرجعي للكرمة الذراع الأسود الميت

الذي يعتبر نظاما معقدا يتطلب تطوير حل بديل يقوم على الدور المضاد للكائنات الحية الدقيقة كمؤشرات طبيعية في تحفيز الدفاع الطبيعي للنباتات

ويركز عملنا على الوصف الأنزيمي ل *Trichoderma sp*، والتي أظهرت قدرتها على إنتاج الأيض المتقلبة وغير المتقلبة، phytohormones والإنزيمات التي تتحلل جدار خلية العوامل الممرضة (chitinase, cellulase, proteases and lipases)

وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن: تطبيق المختبر في *Trichoderma* ضد مسببات الأمراض من جنس *Botryosphaeria* مسبب الموت الغير الرجعي للكرمة أظهرت نشاطا معاديا كبيرا من خلال المواجهة المباشرة أو غير المباشرة ومن خلال ثقافة الترشح حيث أعاققت بشكل كبير النمو لجميع الكائنات الممرضة التي تم اختبارها بنسب تثبيط متغيرة (19% إلى 62% مقارنة بالضوابط)

وأظهرت الملاحظات المجهرية بالقرب من منطقة الاتصال lysis، mycoparasitism، vacuolation، من خيوط الممرض

وكشفت هذه الدراسة عن قدرة *Trichoderma* على العمل من خلال المضادات الحيوية ضد *Botryosphaeriaceae* من خلال إطلاق المواد النشطة المتقلبة وغير المتقلبة على النمو الفطري وسمحت نتائج اختبار أمراض قصاصات الكرمة في الموقع بظهور الآفات بعد فترة من الزمن، وقد سجلت الآفات الأكثر أهمية على صنف *Datale* ل، تليها *Muscat d'italie*، في حين لوحظت آفات ضعيفة على الجذر

انخفاض ملحوظ في النخر الناجم *Botryosphaeria dothidea* ومعاملتها من قبل *Trichoderma sp*. في نفس الأصناف *Datale Muscat d'italie*.

Trichoderma sp أظهرت تأثير هام على تحفيز طول الجذر لبعض الأصناف. بلغ طول جذور *Victoria* 9 سم و *muscat d'italie* بلغت 8.9 سم. من أجل التعرف على المادة الفعالة للمضاد، تم إجراء تحليل كيميائي من قبل طريقة FTIR وكشفت هيمنة. Acids, Alcanes, Alcohols and phenols, aromatic group, carboxylic acids, amides and lactams

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للفطر، *Trichoderma sp*، FTIR، Hydrolytic enzymes، *Botryosphaeria sp.*

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Listes des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Données générale sur la vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	3
1.1. Importance économique de la filière viticole	3
1.1.1 Au Niveau Mondiale.....	3
1.1.2 En Algérie	4
1.2. Les principales maladies du bois de la vigne	6
1.2.1. L'eutypiose	6
1.2.2. L'Esca.....	7
1.2.3. Black Dead Arm	10
1.2.4. Cycle biologique des <i>Botryosphaeriaceae</i>	12
1.3. Méthodes de lutte	13
1.3.1. Lutte chimique.....	13
1.3.2. Mesures préventives	14
1.3.3. Lutte biologique	14
1.3.4. Recherche des microorganismes antagonistes	15
1.3.5. Recherche de molécules naturelles	15
2. Généralités sur les <i>Trichoderma sp</i>	17
2.1. Historique et taxonomie de <i>Trichoderma</i>	17
2.1.1. Approche morphologique	17
2.1.2. Approche moléculaire	20
2.2. Ecologie et habitat	20

2.3. Utilisation du genre <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique	22
2.4. Mode d'action de <i>Trichoderma sp</i>	22
2.4.1. Antibiose	22
2.4.2. Compétition pour les nutriments et l'espace.....	23
2.4.3. Induction de la résistance systémique (ISR)	23
2.4.4. Le mycoparasitisme	25
Chapitre II : Matériel et méthodes	27
1. Matériel biologique	27
1.1. Matériel fongique	27
1.2. Matériel végétal	28
2. Milieux de culture.....	29
3. Purification des champignons	29
4. Etude de l'activité enzymatique de la souche antagoniste	29
4.1. Production de chitinase	29
4.2. Production de cellulase	30
4.3. Production de protéase	30
4.4. Production d'amylase	30
4.5. Production de ligninase	30
4.6. Production de lipase	31
4.7. Production de phytohormone : l'acide indolylacétique (AIA)	31
5. Analyse chimique des extraits de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp.</i> par FTIR (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)	32
5.1. Préparation des extraits de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp.</i>	32
5.1. Analyse par FTIR	32
6. Activité antagoniste <i>in vitro</i>	32
6.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture	32
6.2. Production des substances volatiles (Confrontation à distance)	33
6.3. Analyse <i>in vitro</i> de l'effet de filtrat de culture de <i>Trichoderma</i>	34
7. Activité antagoniste <i>in Situ</i>	35
7.1. Méthodologie	35
7.2. Le Protocol utilisé.....	35

7.3. Evaluation des taux d'infection	37
7.4. Paramètres agronomiques	37
7.4.1. Longueur de partie aérienne (H)	37
7.4.2. Longueur du système racinaire (LR)	37
7.5.Re-isolement	37
8. Analyse statistique	38
Chapitre III :Résultats et Discussion	39
1. Etude macroscopique et microscopique des isolats	39
1.1. Caractérisation macroscopique et microscopique de l'agent antagoniste	39
1.2. Caractérisation macroscopique et microscopique de l'agent pathogène	39
2. L'activité enzymatique de l'antagoniste	43
2.1. Production de la chitinase	43
2.2. Production de la cellulase	44
2.3. Production de l'amylase	44
2.4. Production de la ligninase	45
2.5. Production de la lipase	45
2.6. Production de la protéase	46
2.7. Production des phytohormones AIA (Acide indole acétique)	46
3. Analyse chimique d'extrait de filtrat de culture de <i>Trichoderma</i> sp par Spectroscopie Infrarouge a Transformée de Fourier (Ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)	49
4. Pouvoir antagoniste et mode d'action de <i>Trichoderma</i> sp in vitro vis-à-vis des agents phytopathogènes (<i>Botryosphaeriaceae</i>) ...	53
4.1. Confrontation directe sur milieu de culture entre les pathogènes et l'antagoniste.	53
4.2. Confrontation à distance	57
4.3. Analyse <i>in vitro</i> de l'effet des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i>	58
5. La réponse des boutures de la vigne aux différents agents fongiques	67
5.1.Descriptif symptomatologique	67

(i) Inoculation indépendante (l'agent pathogène)	67
(ii) Co- inoculation (pathogène * antagoniste)	69
5.2. Etude comparée de la variation de la taille des lésions provoquées sur les boutures de vigne en fonction du temps en fonction du traitement testé et en fonction de la variété	77
5.3. Le ré-isolement	79
5.4. Evaluation de la phytostimulation	81
5.4.1. Les paramètres agronomiques	81

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

La vigne n'est pas indispensable à la vie de l'homme, mais dans l'antiquité sa mise en culture a été considérée dans tout le bassin Méditerranéen comme un avancement dans la civilisation (Galet, 1995). L'homme se nourrit de ses fruits, avant même d'entreprendre sa transformation, ses baies juteuses et sucrées lui sont apparus comme un complément indispensable à son alimentation, par leurs vertus rafraîchissantes, énergétiques et diurétiques (Crespy, 2009).

Les conditions pédoclimatiques de l'Algérie sont très favorables au développement et à l'extension de cette culture ; d'ailleurs plusieurs régions à vocation viticole, connues à travers le pays, ont été encouragées ces dernières années à travers le programme de soutien (FNRDA : Fond National de régulation et développement agricole) qui a démarré à partir de la campagne agricole 2000/2001.

Les maladies du bois sont considérées comme très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole. Les parasites responsables de ces maladies provoquent à plus ou moins long terme la mort du cep et peuvent nécessiter un renouvellement des plants pouvant atteindre plus de 10% d'un vignoble (Grosman,2008).

De nombreuses études ont relaté l'action de ces maladies sur le dépérissement des vignobles, les champignons lignivores, tels que *Phomopsis viticola* (Sacc.) (Agent causal de l'excoriose de la vigne), *Eutypa lata* (agent causal de l'eutypiose), les agents du complexe de l'esca, *Fomitiporia punctata*, *Fomitiporia mediterranea* , *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora*, et le genre de *Botryosphaeria* (agent causal du BDA.) sont responsables des altérations du bois et les symptômes peuvent affecter la totalité du cep (les feuilles, les bourgeons, les rameaux, etc...). Non seulement elles sont à l'origine de pertes de rendement et de qualité mais surtout elles causent une mortalité importante. L'impact économique des maladies du bois est donc réel pour les viticulteurs, or il n'existe pas de solution curative à proprement parler.

Le dépérissement causé par *Botryosphaeria* est une maladie de la vigne du tronc, c'est un agent fongique qui représente actuellement une menace pour la viticulture dans le monde entier en raison des importantes pertes économiques dus à une baisse de plantes touchées et leur mort prématurée. *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia seriata* sont parmi les agents causaux (Phillips *et al.*, 2013)

Plus d'une vingtaine d'espèces de Botryosphaeriaceae sont répertoriées comme pathogènes sur *Vitis vinifera*, isolées de différents organes et d'entre elles sont testées pour leur pouvoir pathogène (Van Niekerk *et al.*, 2006).

La lutte contre les maladies du bois est actuellement engagée. Des études épidémiologiques et des travaux sur l'incidence des pratiques culturales ont débuté. Afin d'améliorer la prophylaxie et la production de matériel sain, des méthodes de diagnostic précoce des maladies sont élaborées actuellement. Des molécules chimiques ou biologiques pouvant substituer l'arsénite de soude sont criblées *in vitro* et en champs.

Parmi les agents exploités en lutte biologique vis-à-vis des Botryosphaeriaceae, des isolats fongiques antagonistes : *Trichoderma* sp ont été reconnues comme des agents potentiels de biocontrôle. Les effets de ces agents antagonistes peuvent non seulement permettre de stimuler la croissance des plantes mais aussi de s'opposer aux agents phytopathogènes (Prévost *et al.*, 2006 ; Lehr *et al.*, 2008).

Les *Trichoderma* spp. Sont parmi les champignons du sol qui ont un potentiel antagoniste significatif contre une large gamme de champignons phytopathogènes (Tondje *et al.*, 2007).

Les *Trichoderma* sont déjà commercialisés pour le contrôle biologique de nombreux agents pathogènes des plantes. Ils sont caractérisés par une croissance rapide, une aptitude importante à la compétition et à la stimulation des systèmes de défense. Ils sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines des plantes (Verma *et al.*, 2007 ; Vinale *et al.*, 2008).

L'objectif de cette étude réside dans l'évaluation de l'efficacité d'un agent antagoniste : *Trichoderma* spp vis à vis trois espèces fongiques pathogènes appartenant à la famille des Botryosphaeriaceae, pour cette raison nous avons essayé de répondre à la problématique suivante :

- Quel est l'effet de l'activité antagoniste *in vitro* et *in planta* de *Trichoderma* sp vis-à-vis des phytopathogènes impliqués dans le dépérissement de la vigne ?
- Quel est le mode d'action de *Trichoderma* sp contre les pathogènes testés ?
- Quels types d'enzymes possède cette souche antagoniste ?
- Quelle est la composition chimique de cette souche antagoniste ?

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. Données générale sur la vigne (*Vitis vinifera*)

La vigne, plante grimpante pérenne, appartient au genre *Vitis*. Elle fait partie des angiospermes dicotylédones de la classe des *Magnoliopsida*, de l'ordre des *Rhamnales* (Chadefaud et Emberger, 1960). La famille des *Vitacées*, comprend 14 genres différents (Ren et al., 2011) dont le genre *Vitis*, qui est le seul utilisé, de part le monde, pour produire du raisin. Ce genre se divise en deux sous-groupes : *Muscadina* et *Euvitis* (Levadoux, 1956). Qui présentent des caractères anatomiques, morphologiques et cytologiques distincts (Olmo, 1978 ; Huglin et scheider, 1998).

La Vigne effectue au cours de son développement deux cycles en concurrence trophique. Le cycle végétatif assure la pérennité du cep grâce au développement de l'appareil végétatif et le cycle reproducteur permet la formation des fleurs, puis des fruits (Coombe et Dry, 1988).

1.1. Importance économique de la filière viticole

1.1.1. Au niveau Mondiale

La Vigne est une des espèces fruitières les plus cultivées dans le monde. Le vignoble mondial s'étend sur les cinq continents. La majorité des surfaces viticoles mondiales sont situées en Europe (59%), les superficies sont concentrées surtout en Espagne, 1 032 000 ha, en France : 807 000 ha et en Italie, 776 000 ha le reste étant réparti entre l'Asie (22%), l'Amérique (12,5%) et l'Afrique (4,9%) (O.I.V, 2011). Les statistiques de l'O.I.V font ressortir une nette diminution des surfaces mondiales de vigne depuis une dizaine d'années : la baisse cumulée au cours des dix dernières années s'est élevée à 262.000 ha. En 2011, le vignoble mondial a atteint son niveau le plus bas des dix dernières années avec 7,58 millions ha. Malgré la campagne d'arrachage mise en place par la Commission européenne, il est à signaler dans ce laps de temps, la belle progression du vignoble chinois qui a presque doublé dans la dernière décennie (+ 89 %) et de la Nouvelle-Zélande, qui a presque triplé sa surface entre 2000 et 2011 (de 14 à 37.000 ha). La production annuelle mondiale de vin est estimée à 265 millions d'hl. L'Europe, avec environ 74% de cette production occupe une place prépondérante. Cependant,

l'augmentation régulière de la production des pays dits du Nouveau Monde (U.S.A., Argentine, Chili, Australie et Afrique du Sud) est à signaler.

1.1.2. En Algérie

La superficie du vignoble Algérien est d'environ 74.000 ha (O.I.V), les grandes régions viticoles sont situées au nord et au centre du pays. Depuis l'indépendance, le secteur viticole Algérien a connu des bouleversements profonds engendrés par des mutations d'ordre politique et socio-économique. Les surfaces cultivées ont considérablement diminué suite à des arrachages et à la faiblesse de production.

Ces dernières années la viticulture a pris une place importante dans la nouvelle vision du développement du secteur agricole, à travers le plan national de développement Agricole (P.N.D.A.), qui a été initié à partir de l'an 2000, qui vise à relancer cette culture en Algérie, notamment dans les régions à vocation viticole et montagneuse avec toutes les retombées positives en matière de protection des sols, de production et de création d'emplois. Pour ce faire, les pouvoirs publics ont mis en place un ensemble de mesures d'encouragement visant justement la réhabilitation de cette culture et son intensification (Ammad, 2006).

Selon les données obtenues auprès des services de production du Ministère de l'Agriculture et du Développement rural (2014) (**Tab.1**), il apparaît clairement un regain d'intérêt envers cette culture. En effet, les surfaces viticoles progressent d'année en année en s'orientant plus vers les raisins de table avec une diversification variétale. Une nette augmentation des superficies viticoles est enregistrée pendant la période qui s'étale de 1998 au 2005, ces dernières ont presque doublées, la superficie viticole a atteint 100.202 ha en 2005. En dépit des encouragements des viticulteurs à travers le programme P.N.D.A., l'extension du vignoble Algérien est marquante, mais le potentiel productif reste tributaire de conduites culturales (Ammad, 2015). En observant les rendements réalisés chaque année, il en ressort une certaine faiblesse dans la gestion de la production. En plus des difficultés inhérentes aux aspects phytotechniques (choix de cultivars, technique de conduite et autres) l'aspect phytosanitaire contribue dans cette régression de la production à plus d'un titre et en termes de superficie notée en 2006 jusqu'à ce jour.

Tableau 1. Situation sur l'évolution de la viticulture en Algérie (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, 2014)

nd : non donné, CPM : la superficie du champ de pied mère est comptabilisée dans le total vignoble

	2000			2001			2002		
	Sup. ha	Prod. qx	Rend qx/ha	Sup. ha	Prod. qx	Rend. qx/ha	Sup. ha	Prod. qx	Rend qx/ha
Vignoble	58 833	2 038 010	34,6	68 540	1 961 590	29,3	79 990	2 343 970	29,3
Vigne de table	34 150	1 621 540	54,0	38 260	1 612 580	53,1	41 860	1 881 390	59,2
Vigne de cuve	24 570	414 630	19,9	30 190	347 570	16,6	38 010	458 510	20,6
Vigne à raisin sec	110	1 840	16,7	90	1 440	16,0	120	4 070	37,0
	2003			2004			2005		
Vignoble	94 025	2 779 680	29,56	97 696	2 839 000	45,4	100 202	3 340 210	48,0
Vigne de table	45 380	619 140	24,1	47 070	616 000	23,4	47 668	727 090	22,3
Vigne de cuve	48 520	2 157 440	62,3	50 465	2 220 550	61,6	52 406	2 610 280	70,8
Vigne à raisin sec	125	3 100	27,0	161	2 450	20,2	128	2 840	23,9
	2006			2007			2008		
Vignoble	97 063	3 980 180	52,9	91 930	2 449 990	31,9	86 665	4 019 915	54,5
Vigne de table	44 170	807 020	22,8	38 044	406 860	11,8	34 332	621 557	19,6
Vigne de cuve	52 769	3 170 600	80,0	53 772	2 040 470	48,3	52 224	3 396 188	81,1
Vigne à raisin sec	124	2 560	22,7	114	2 660	24,9	109	2 170	22,4
	2009			2010			2011		
Vignoble	82 184	4 925 252	63,8	79.855	5.604.000	70.2	77.461	4.025.950	51.97
Vigne de table	31 051	728 450	27,9	50.482	4.743.285	114.3	49.338	3.499.150	77.7
Vigne de cuve	51 029	4 194 537	97,7	29.373	860.715	29.3	28.049	525.120	18.72
Vigne à raisin sec	104	2 265	23,4	75	1620	21.6	74	1680	22.70
	2012			2013			2014		
Vignoble	74.079	5.431.690	73.3	73.35	5.707.540	77.81	nd	nd	nd
Vigne de table	47.224	4.432.566	111	47.02	4.829.497	102.70	nd	nd	nd
Vigne de cuve	26.827	697.404	25.9	26.29	878.043	33.39	nd	nd	nd
Vigne à raisin sec	58	1720	29.7	38	860	22.63	nd	nd	nd

En effet, la vigne est sensible à de nombreuses maladies dues à divers agents pathogènes : virus, phytoplasmes, bactéries, insectes et champignons. Néanmoins, la majorité des pesticides utilisés en viticulture sont des fongicides. En moyenne, 7 à 19 traitements sont appliqués par parcelle au cours d'une saison (Agreste). Les principales maladies visées par ces traitements sont le mildiou et l'oïdium et dans une moindre mesure la pourriture grise qui sont respectivement dues aux agents *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* et *Botrytis cinerea*. Ces affections atteignent les organes herbacés de la vigne et peuvent être maîtrisées en conjuguant une prophylaxie et un usage des traitements chimiques. Cependant, depuis une vingtaine d'années des maladies cryptogamiques touchant les vaisseaux conducteurs de sève de la vigne ont émergés.

1.2. Les principales maladies du bois de la vigne

Les maladies du bois de la vigne sont devenues préoccupantes durant les vingt dernières années. Trois maladies sont plus précisément décrites et étudiées. Il s'agit de l'eutypiose, de l'esca et du Black Dead Arm (BDA). Ces maladies vasculaires sont associées à des champignons inféodés aux vaisseaux du xylème (Bertsch et al., 2013).

1.2.1. L'eutypiose

L'ascomycète généraliste *Eutypa lata* (Pers. : Fr.), (anamorphe *Libertella blepharis* A. L. Smith) colonise le tronc de plus de 80 espèces de ligneux. Les vignes atteintes d'eutypiose présentent un rabougrissement sévère des rameaux (**Fig. 1 a et b**). Les feuilles de ces rameaux sont chlorotiques et développent des nécroses en périphérie du limbe et entre les nervures. Les spores sont produites toute l'année et dispersées lorsqu'un épisode pluvieux dépasse 0.5 mm. Le phytopathogène envahit les tissus vasculaires du tronc via les plaies de taille (Jiménez-Teja et al., 2006). Le xylème infecté présente une nécrose brune en forme de V (**Fig. 1 c**).

Les métabolites secondaires nécessaires à l'infection par *E. lata* ; Il s'agit de composés acétyléniques et hétérocycliques. L'eutypine, 1,4-hydroxy-3-(3-méthylbut-3-ène-1-ynyl) benzaldehyde, est la phytotoxine principale produite par *E. lata* (Jiménez-Teja et al., 2006).

Des composés découlant de la même voie de biosynthèse (eutypinol, sicayne, acide eutypinique, eutypoxideB) ont également été isolés à partir de cultures sur boîtes et possèdent différentes cibles dans la vigne (Andolfi et al., 2011). Les postulats de Koch ont été validés pour cette maladie. *E. lata* a également été isolé dans le bois de vignes présentant des signes avancés d'esca. Cette espèce ferait donc partie des microorganismes pionniers formant le complexe fongique associé à l'esca (Bertsch et al., 2013).

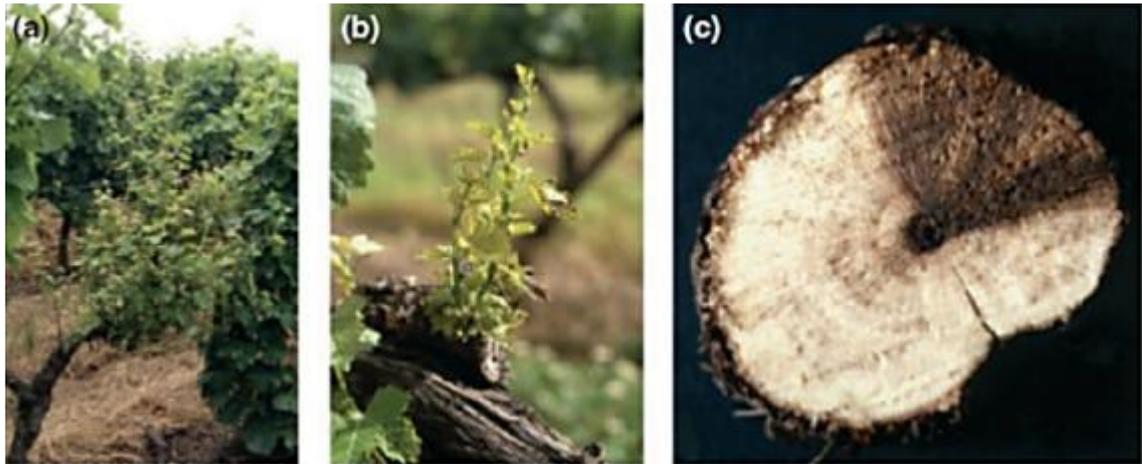


Figure.1 : Les symptômes au niveau du bois de *Vitis vinifera* atteintes d'eutypiose, (a) et (b) rameaux rabougris. (c) nécrose brune en forme de V (Bertsch et *al.*, 2013).

1.2.2. L'Esca

L'esca, maladie cryptogamique, Elle a été décrite tout d'abord sous sa forme apoplectique (Marès et *al.*, 1865), en 1922, le terme esca a été introduit pour désigner cette maladie caractérisée par la présence d'une pourriture blanche et par la forme apoplectique (Viala et *al.*, 1922). D'autres formes d'expression ont été décrites sous le nom d'apoplexie lente (Arnaud, 1931).

La première maladie connue actuellement sous le nom de forme lente de l'esca, est caractérisée par des digitations jaunes (cépages blancs) ou rouges, bordées de jaune (cépages noirs) entre les nervures qui restent vertes. La deuxième se caractérise également par la présence de digitations inter-nervaires, mais se distingue de la forme lente de l'esca par l'absence de liseré jaune dans les premiers stades de l'apparition des symptômes (**Fig. 2 a**). Cette forme lente est caractéristique d'une autre maladie connue sous le nom de forme lente du Black Dead Arm (Larignon et *a.l.*, 2001). Ces auteurs décrivent également un autre aspect des symptômes qui est caractérisé par un rabougrissement des rameaux, symptôme caractéristique d'une autre maladie de la vigne, l'eutypiose (Moller et *al.*, 1974).

Les symptômes sur fruits se traduisent soit par un retard dans leur maturation, soit par leur flétrissement (Dubos et *al.*, 1987). Les fruits peuvent présenter des taches brunes violacées à leur surface. Ces symptômes sont en association ou non avec les symptômes foliaires (Chiarappa, 1959).

La forme lente de l'esca est associée à différentes nécroses dans le bois (**Fig. 2b**). Elle peut être reliée à une pourriture blanche à la présence d'une nécrose brune en position centrale

(Larignon et al., 1997), ou à des ponctuations noires (correspondant à des vaisseaux nécrosés) lorsque la maladie n'est pas très évoluée ou avancée (Pascoe et al., 2002).

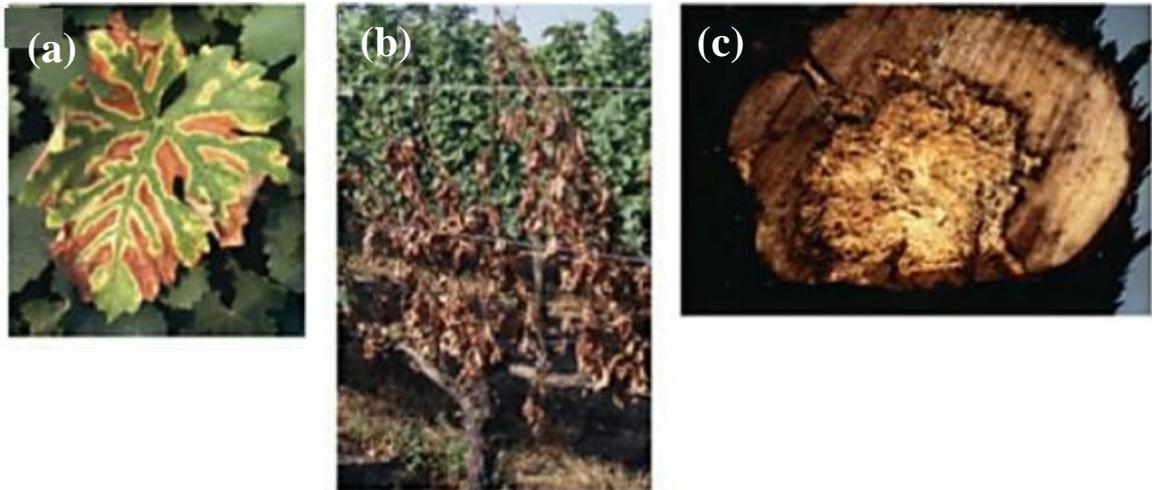


Figure.2 : Les symptômes au niveau du bois et des feuilles de *Vitis vinifera* atteintes d'esca (a) décolorations foliaires particulières, (b) dépérissement soudain du cep (c) pourriture centrale blanche observable dans les ceps sévèrement atteints (Bertsch et al., 2013).

Deux processus menant à la formation de cette nécrose ont été décrits (Larignon, 1991 ; Larignon et al., 1997), le premier processus aboutit à la formation d'une nécrose claire et tendre en position centrale et fait intervenir trois champignons : *Phaeoacremonium aleophilum* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) et *P. chlamydospora* Crous et W. Gams, gen. nov.), trouvés dans une nécrose brune et dure en position centrale, et *Fomitiporia mediterranea* Fischer (= *Fomitiporia punctata* (Fr. ex Karst.) Murrill = *Phellinus punctatus* (P. Karst.) Pilát), responsable de la pourriture blanche.

Le deuxième processus conduit à la formation d'une nécrose claire et tendre en position sectorielle et implique *Eutypa lata* (Pers : Fr.) Tul & C. Tul, responsable de la nécrose brune en position sectorielle et *F. mediterranea* qui dégrade ce bois brun en une pourriture blanche. Les deux processus peuvent être observés sur la même.

Des expérimentations sur la pathogénie ont montré que les champignons sont capables de provoquer les symptômes dans le bois. *P. chlamydospora*, inoculé dans des boutures, provoque des ponctuations noires, identiques à celles observées dans le vignoble (Larignon et al., 1997 ; Pascoe et al., 2000, Trocoli et al., 2001). Suite à des inoculations artificielles de

boutures, *P. aleophilum* peut provoquer des nécroses sectorielles dans le bois (Larignon et al., 1997).

Concernant *F. mediterranea*, les tests réalisés sur du bois sain, prélevé sur le tronc de ceps montrent qu'il dégrade le bois en une pourriture blanche, nécrose caractéristique de l'esca. Il en est de même pour *S. hirsutum*, ce champignon peut également provoquer, contrairement à *F. mediterranea*, de telles nécroses lorsqu'il est inoculé dans les tiges ligneuses de boutures (Larignon et al., 1997). Aucune expérimentation n'a été réalisée jusqu'à aujourd'hui pour valider les différents processus menant à la dégradation du bois caractéristique de l'esca.

En réponse à une agression par des pathogènes, la plante met généralement en place des défenses afin de limiter leur progression (Shigo et al., 1977).

Dans le cadre de l'esca, la période de latence entre l'inoculation des champignons et l'expression des symptômes foliaires est de plusieurs années, ce qui suggère un contrôle de la propagation des champignons par la plante suite à l'induction de défenses et/ou la production de molécules spécifiques. A l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées sur les interactions hôte-parasite dans le cas de l'esca. L'observation des nécroses de ceps de Cabernet-Sauvignon prélevés *in natura* par des méthodes histochimiques montre que la plante met en place différentes barrières pour limiter la progression des champignons dans le bois (Larignon, 1991): des thylls et des gommages dans les vaisseaux et l'augmentation de composés phénoliques dans les tissus ligneux au niveau de la zone brun rose. Amalfitano et al, (2000), constatent une accumulation de transresvératrol et de ϵ -viniférine dans ces mêmes zones sur le cépage Sangiovese. Les formations de thyllose associées à des changements de taux et de composition de composés phénoliques ont été mises en relation avec la sévérité de l'infection dans des racines infectées par *P. chlamydospora* et plusieurs espèces de *Phaeoacremonium*.

Cette accumulation de composés phénoliques dans les tissus infectés par les pathogènes est probablement régulée par un équilibre entre la production par les cellules végétales et la détoxification par les pathogènes. Sur des boutures inoculées par *P. chlamydospora*. Larignon (1991), Pascoe et Cottral (2000) ; Troccoli et al, (2001), constatent la formation de gommages et de thylls dans les vaisseaux, et la présence de substances non identifiées, probablement de type stilbène.

1.2.3. Black Dead Arm

Le Black Dead Arm connu depuis très longtemps sous le nom d'apoplexie (Arnaud, 1931). Est encore souvent confondu avec l'esca car la symptomatologie est très similaire. Il est présent dans différents pays viticoles : Espagne (Tuset et *al.*, 1980). Italie (Cristinzio , 1978), France (Larignon et *al.*, 2001), Chili (Augere et *al.*, 2004) et Liban (Choueiri et *al.*, 2006).

Le terme Black Dead Arm a été introduit par Lehoczky (1974), pour distinguer cette maladie du dead arm disease qui est provoqué par *Phomopsis viticola* Sacc. Ce terme a ensuite été repris par (Cristinzio ,1978) pour désigner les symptômes foliaires qui sont caractérisés par des digitations internervaires sans liseré jaune dans les premiers stades d'apparition des symptômes chez les cépages noirs. Sur les cépages noirs, le suivi des feuilles tout au long de la période végétative montre que les tissus de couleur rouge vineux s'éclaircissaient pour devenir rouge clair, puis présentaient à leur périphérie des jaunissements (Larignon et *al.*, 2001), cette observation suggère à Lecomte et *al.*, (2006), que le faciès BDA était une phase transitoire de l'expression de la forme lente de l'esca.

Des études sur le profil anthocyanique de feuilles atteintes par le BDA ou l'esca à des stades précoces d'expression foliaire montrent qu'ils sont différents, signe de dérèglements du métabolisme foliaire, spécifiques de chaque dépérissement (Larignon et *al.*, 2003).

Ces symptômes sont en relation avec une bande brune dans le bois située sous l'écorce pouvant aller jusqu'au niveau de la soudure, voire du porte-greffe, Cette bande brune peut se former de part et d'autre d'une nécrose sectorielle et se traduire ensuite soit par la présence de taches noires, soit par la formation d'un chancre. Une forme sévère caractérisée par une défoliation des rameaux est également connue (Larignon et *al.*, 2001) (**Fig.3, a, b, c, d, e**).

Les *Botryosphaeria* spp représentent un groupe très divers de champignons ascomycètes capables d'affecter de nombreuses plantes ligneuses dont la vigne, les eucalyptus (Smith et *al.*, 1996) et les oliviers (Moral et *al.*, 2008), sur vigne, il existe de nombreuses études associant ce groupe d'ascomycètes à des dépérissements.

Les *Botryosphaeria* spp. produisent des composés phénoliques toxiques (Djoukeng et *al.*, 2009) : la mélléine, la (3R, 4R) cis-4-hydroxymélléine, (3R) -7-hydroxymélléine, et la (3R,4R) -cis-4,7-dihydroxymélléine. D'après Djoukeng et *al.*, (2009) la mélléine, bien que produite également par des champignons du genre *Aspergillus* (Cole and Kirskey, 1971 ; Sasaki et *al.*, 1970), peut donc être utilisée comme un marqueur de la présence des *Botryosphaeria* spp dans le cadre des maladies du bois.



Figure. 3 : Les symptômes au niveau du bois et des feuilles de *Vitis vinifera* de Black Dead Arm également appelé chancre à *Botryosphaeria*, (a) feuilles tigrées proches des symptômes d’escas mais sans présence d’une bande jaune chlorosée entre la nervure et le limbe nécrosé rouge, (b) nécroses sectorielles en forme de V , (c) chancres bruns, (d) dessèchement des fruits, (e) défoliation des rameaux. A noter également que les entre-coeurs sont défoliés et desséchés à partir de leur extrémité (Bertsch et al, 2013).

Aujourd’hui, les espèces de *Botryosphaeriaceae* sont très souvent désignées par le nom de leur forme anamorphe puisque les formes téléomorphes sont rares (Denman et al, 2000, Crous et al, 2006).

Les espèces les plus répandues à travers le monde sont : *Diplodia seriata* (téléomorphe *Botryosphaeria obtusa* ; Shoemaker, 1964), *Diplodia mutila* (téléomorphe *Botryosphaeria mutila* ; Shoemaker, 1964), *Neofusicoccum parvum* (téléomorphe *Botryosphaeria parva* ; Pennycook , Samuels, 1985), *Neofusicoccum australe* (téléomorphe *Botryosphaeria australis* ; Slippers et al., 2004), *Neofusicoccum luteum* (téléomorphe *Botryosphaeria lutea* ; Phillips et al., 2002), *Fusicoccum aesculi* (téléomorphe *Botryosphaeria dothidea* ; Corda, 1829), *Lasiodiplodia theobromae* (téléomorphe *Botryosphaeria rhodina* ; (Phillips, 2002).

- **Comportement des cépages.**

Peu d'informations sont données sur la sensibilité des cépages. Il est connu que les cépages Cabernet Sauvignon, Cabernet franc, Sauvignon blanc sont plus sensibles à ce dépérissement que le Merlot (Larignon et *al.*, 2001).

- **Interactions hôte-pathogène**

Aucune étude spécifique caractérisant l'impact du BDA sur différents métabolismes de la plante (métabolisme carboné, hydrique ou encore la mise en place de défenses) n'a été publiée.

Les travaux dédiés à la recherche et l'identification de molécules toxiques produites par les différentes espèces de *Botryosphaeria* sont très récents et limités.

En effet, Martos et *al.* (2008), ont isolé pour la première fois des molécules de nature polysaccharidique. Ces molécules développent une forte toxicité lorsqu'elles sont testées sur le modèle simplifié feuille isolée.

Récemment, Djoukeng et *al.* (2008), ont isolé 4 molécules qui sont respectivement la mélléine, les 4- et 7-hydroxymélléine et la 4,7-dihydroxymélléine. Elles ont également montré une forte toxicité lors de tests sur disques foliaires. Ces chercheurs ont également observé que *B. obtusa* oxydait le resveratrol en δ -viniferine dans le bois, ce qui indique une forte activité laccase. Ces expériences ayant été menées uniquement en conditions contrôlées, il faut maintenant caractériser la production de ces composés dans des plantes naturellement infectées.

1.2.4. Cycle biologique des *Botryosphaeriaceae*

Les différents champignons de cette famille se conservent sous forme de pycnides et/ou périthèces (lorsque la forme téléomorphe existe) localisées sur l'écorce, les plaies de taille ou les bois morts laissés au sol. Ces champignons peuvent survivre en saprophytes, ce qui leur permet d'être présents sur de nombreux substrats, source d'inoculum potentiel.

Une étude, réalisée en France a montré que les conidies produites dans les pycnides sont disséminées durant la période végétative de la vigne lorsque les conditions sont humides et pluvieuses (Kuntzmann et *al.*, 2010).

Elles sont observées durant la période hivernale en Californie (Urbez-Torres et *al.*, 2010). Les *Botryosphaeriaceae* pénètrent par les blessures consécutives à la taille ou le greffage et colonisent le bois. Ils y demeurent à l'état endophyte ou de pathogènes latents. Ces

champignons peuvent être transmis aux plants à partir des bois issus de plants de vignes mères contaminées et pendant le processus de fabrication (Gramaje et Armengol, 2011).

1.3. Méthodes de lutte

Le problème majeur des maladies du bois de la vigne réside dans l'absence totale de traitement curatif, l'application des mesures prophylactiques est recommandée. De nombreux axes de recherche se poursuivent actuellement visant à la mise au point de traitements phytosanitaires efficaces : micro-organismes antagonistes naturels (Alfonzo et *al.*, 2009), composés antifongiques systémiques de synthèse (Auger et *al.*, 2010 ; Herche et Gubler, 2010) et des molécules naturelles possédant des propriétés fongicides ou stimulant les réactions de défense des plantes comme le chitosane (Nascimento et *al.*, 2007), les polyphénols (Hattenschwiler et Vitousek, 2000) et l'acide salicylique (Amborabé et *al.*, 2002).

1.3.1. Lutte chimique

Depuis le retrait de l'homologation de l'arsénite de soude du marché Européen en 2001, aucune solution de remplacement efficace et économiquement acceptable n'a été proposée à la profession viticole (Bertsch et *al.*, 2009). Des études récentes menées par la Mutualité Sociale Agricole (MSA) (France) ont montré que l'arsénite de soude était dangereux pour la santé des utilisateurs en dépit des précautions prises lors de son application (Herlemont, 2004). Il était capable de tuer la plupart des champignons associés aux maladies du bois dans le xylème comme le montrent les travaux de Larignon et *al.*, (2008). Il n'avait toutefois aucune efficacité sur l'eutypiose (Larignon, 2009). En effet, sa réintroduction serait une aberration, tant au niveau écologique qu'au niveau pratique (Viret, 2004).

La difficulté de cette lutte réside dans le fait que les antifongiques traditionnels ne sont pas mobiles dans tout le système de la plante (phloème et xylème). Le plus pratique serait d'élaborer des fongicides systémiques phloémiens dotés d'une propriété particulière : l'ambimobilité. De tels composés peuvent passer du liber (phloème) vers le bois (xylème), et ainsi atteindre les champignons parasites. Bien qu'il soit difficile d'effectuer les modifications de structures moléculaires pour obtenir cette propriété tout en conservant les propriétés fongicides de la molécule initiale. Les fongicides classiques, utilisés actuellement sont soit de contact, auquel cas, ils restent en surface des plantes traitées, soit systémiques ascendants, véhiculés avec la sève brute depuis les racines vers le feuillage. Ce qui explique que le seul remède proposé jusqu'ici consiste en un badigeonnage des plaies de taille, afin de constituer une barrière pour stopper l'envahissement par les spores de champignons parasites (Jousse, 2004).

1.3.2. Mesures préventives

La lutte contre les maladies du bois est essentiellement préventive à l'heure actuelle. Les mesures prophylactiques ont pour objectif de réduire la quantité d'inoculum dans les vignobles et de diminuer les risques de contamination à la pépinière. Bien que considérées comme nécessaires, il est impossible d'affirmer que ces mesures soient suffisantes comme moyen de lutte efficace contre les agents causaux des maladies du bois (Sentenac et *al.*, 2004).

La flore fongique associée aux maladies du bois se propagent surtout par le matériel végétal (Larignon et *al.*, 2006). Parmi les traitements effectués à la pépinière, les traitements à l'eau chaude se sont avérés efficaces pour diminuer les sources d'inoculum (Crous et *al.*, 2001 ; Rooney et Gubler, 2001), bien que l'efficacité de ce traitement dépende de la sensibilité des champignons (Casieri et *al.*, 2009). Fourié et Halleen (2006), ont montré également que des bains de bénomyl, de captane ou de didecylméthylammonium chloride, réduisent la présence des champignons dans les tissus ligneux au niveau de la soudure et à la base du plant. Ces mêmes auteurs ont indiqué que ces traitements sont également effectués sur les plants à la sortie de la pépinière.

Au vignoble, la lutte contre les maladies du bois consiste tout d'abord en des mesures prophylactiques afin de limiter l'expansion de la maladie à partir de ceps infectés : limiter les apports nutritifs pour contrôler la vigueur, éliminer les bois morts qui sont sources d'inoculum, éviter les tailles sévères qui augmentent la surface des plaies et le risque de contamination et pratiquer une taille tardive afin de réduire la contamination. Les solutions actuelles sont limitées et consistent à pratiquer un recépage au-dessous de la zone infectée en conservant un gourmand à la base du cep. Une précaution élémentaire consiste donc à protéger la plaie de taille. Le surgreffage est également efficace en éliminant la partie malade (Larignon, 2009).

1.3.3. Lutte biologique

La lutte biologique contre les maladies des plantes peut se produire grâce à des mécanismes biologiques qui sont généralement considérés comme l'antibiose, la compétition, le parasitisme, la résistance induite, l'hypo virulence et la prédation (Pal et *al.*, 2006 ; Haggag et *al.*, 2007).

Les différentes recherches menées dans le monde ont porté sur l'évaluation de l'efficacité de molécules chimiques et de produits biologiques aussi bien au laboratoire que dans le vignoble (Jaspers, 2001).

1.3.4. Recherche des microorganismes antagonistes

L'utilisation des organismes antagonistes naturels pour protéger des plaies de taille est une méthode de contrôle préventive et écologique. Les mécanismes intervenant dans ce type de protocole sont liés à une compétition de croissance (espace, nutriments) ou à l'émission de composés antifongiques protecteurs. Les recherches portent de plus en plus sur l'effet de microorganismes utilisés en lutte biologique, notamment les *Trichoderma*. Ces champignons présentent une activité antagoniste et d'hyper parasitisme à l'égard d'un grand nombre de microorganismes et sont utilisés en lutte biologique à l'égard de diverses maladies sur différentes cultures (Chet, 1987). Ils peuvent jouer également un rôle dans l'élicitation des mécanismes de défense de la plante. Selon Hunt et al. (2001), l'application de *Trichoderma* sur les plaies de taille réduit fortement la colonisation du bois par *Eutypa lata* (85%), d'autre part *T. harzianum* est capable de détoxifier *in vitro* l'eutypine en eutypinol ou en acide eutypinique (Christen et al., 2005). De même, d'autres auteurs, ont décrit l'efficacité des souches de *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum* et *T. atroviride* contre *Phaeomoniella chlamydospora* et les *Botryosphaeriaceae* (Di Marco, 2004 et 2011 ; Kotze et al., 2009).

Des bactéries antagonistes d'*E. lata* cas de *Bacillus subtilis* et *Erwinia herbicola* ont été mises en évidence, ces deux bactéries sont actives *in vitro* sur des disques de bois infectés par *E. lata*. Leur activité antifongique est maintenue lorsque le filtrat de culture (sans la bactérie) est appliqué (Ferreira et al., 1991 ; Schmidt et al., 2001a). Elles sont aussi actives en vaporisation sur les plaies de taille au vignoble, *Bacillus subtilis* produit des substances qui inhibent la croissance du mycélium et la germination des ascospores d'*E. lata* (Ferreira et al., 1991). Ces propriétés fongistatiques et fongicides se manifestent uniquement en présence de la bactérie, car il est nécessaire d'avoir un apport permanent en substance active (Schmidt et al., 2001). Ce dernier a souligné que, *Erwinia herbicola* sécrète dans son milieu de culture des molécules de type sidérophores et des molécules antifongiques connues comme l'herbicoline ou la pyrrolydine. Ces deux bactéries présentent une survie supérieure à quatre semaines, période pendant laquelle l'infection par *E. lata* peut se produire suite à la taille.

1.3.5. Recherche de molécules naturelles

Toutes fois des essais portés sur l'utilisation des bio-pesticides d'origine végétales sont encouragés par la recherche notamment des composés secondaires, qui sont réputés depuis l'antiquité pour leurs propriétés pharmacologiques. Depuis quelques décades, l'homme s'intéressait également à leurs autres activités biologiques. Ces composés secondaires sont souvent considérés comme étant un moyen de défense de la plante productrice contre divers organismes comme les pathogènes et les ravageurs. Ils sont très nombreux et variés, et certains

sont largement distribués, comme les alcaloïdes, les terpènes et les tanins, tandis que d'autres ont une répartition plus restreinte comme les composés soufrés (Auger, 2002).

La connaissance de quelques principes liés aux domaines d'utilisation de ces composés s'avère intéressante, aussi la connaissance des espèces vivaces naturelles, à savoir leurs compositions chimiques. Leurs caractères morphologiques offrent aux chercheurs une piste prometteuse pour la découverte de formules adéquates et efficaces contre les bio-agresseurs.

Les composés phénoliques sont connus pour leur activité antifongique en particulier sur les agents responsables des maladies du bois de la vigne (Mugnai *et al.*, 1999 ; Mazullo *et al.*, 2000 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Amborabé *et al.*, 2002 ; Del Rio *et al.*, 2004 ; Santos *et al.*, 2006 ; Djoukeng *et al.*, 2009). L'acide salicylique possède des propriétés antifongiques *in vitro* contre *E. lata* (Amborabé *et al.*, 2002). Il provoque des modifications structurales importantes du mycélium (paroi, mitochondrie, vacuole et noyau). Cette molécule possède un double avantage puisqu'elle existe naturellement dans la plante et qu'elle est impliquée dans les mécanismes de défense. De plus, il a été démontré que cette molécule est transportée *via* le phloème, elle est ambimobile, et peut donc être véhiculée jusqu'au site d'infection par le champignon (Rocher *et al.*, 2006). Une des possibilités envisagées pour optimiser ce transport et l'absorption par le mycélium est le couplage de l'acide salicylique sur des molécules naturelles synthétisées par la plante comme les acides aminés (Chollet *et al.*, 1997 ; Delétage *et al.*, 2001).

2. Généralités sur les *Trichoderma sp*

2.1. Historique et taxonomie de *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été utilisé pour la première fois par le mycologue sud-africain Christiaan Hendrik Persoon en 1794. C'est le premier qui a décrit le genre *Trichoderma* à partir des échantillons collectés en Allemagne. Qui ont été considéré comme des décomposeurs de matière organique (Persoon, 1794).

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).

En 1825, Elias Fries a décrit pour la première fois la forme parfaite « *Hypocrea* » comme étant une espèce avec des ascospores hyalines (Chaverri et Samuels, 2004). En 1865, les frères Tulasne ont suggéré que *Hypocrea rufa* est le téléomorphe de *Trichoderma viride* Pers. Brefeld (1891) a pu obtenir une culture de *T. viride* à partir d'une seule ascospore de *Hypocrea rufa* (Samuels, 2006).

Le genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*) appartient au sous embranchement des Ascomycètes, classe des Sordariomycètes, Ordre des Hypocréales et la famille des Hypocraceae (Chaverri *et al.*, 2015). De 1939 à 1969, toute espèce fongique à spores vertes appartenant au genre *Trichoderma* était considérée comme étant l'unique espèce : *Trichoderma viride* (Bisby, 1939).

2.1.1. Approche morphologique

Selon les auteurs, les espèces du genre *Trichoderma* ont été initialement définies sur la base de caractères morphologiques.

D'après Rifai (1969), la notion « d'espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques anamorphes. Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer. Rifai a créé neuf espèces agrégées de *Trichoderma* : *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viride* (Rifai, 1969). Ce système semble le plus facilement utilisable par la communauté scientifique.

Les sections *Trichoderma* décrites par Bissett (1991a), sont présentées ci-dessous(**Fig.4**)

➤ **Section *Trichoderma***

Les espèces de cette section ont des conidiophores étroits et flexueux avec des branches et des phialides de forme subulée (effilée, en forme d'alène) ou lagéniforme (en forme de bouteille, renflé à la base et restreint en col vers le sommet), peu nombreuses, fréquemment en paires, et possèdent rarement plus de trois éléments dans le verticille. Nous pouvons citer comme exemple les espèces suivantes : *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. viride* et *T. atroviride* P. Karst. Ces deux dernières espèces sont caractérisées par la production d'une odeur de noix de coco caractéristique de l'antibiotique volatil 6-pentyl- α -pyrone (Dodd et al., 2003).

➤ **Section *Longibrachiatum* Bissett**

Caractérisée par des conidiophores peu ramifiés, ayant un grand nombre de phialides solitaires et disposées irrégulièrement, leur forme varie d'ampoule à lagéniforme ou cylindrique. Les espèces de cette section sont caractérisées par une croissance très rapide et la production d'un pigment jaune vert sur milieu PDA. Dans cette section on peut citer les deux espèces *T. longibrachiatum* et *T. pseudokoningii*.

➤ **Section *Saturnisporum* Doi et al.**

Les espèces de cette section possèdent un système de ramification similaire à celui de *T. viride* avec des ramifications et des phialides peu nombreuses et fréquemment en paires, mais avec des phialides gonflées et des pustules conidiennes comme ceux de la section *Pachybasium* ; elles se différencient par les ornements de leur conidie. Cette section a été proposée par Doi et al. (1987) comprenant les deux espèces *T. saturnisporum* Hamill et *T. ghanense* Doi, Abe et Sugiyama. Cependant, les travaux de Kuhls et al. (1997) et Turner et al. (1997) ont permis de classer ces deux espèces dans la section *Longibrachiatum*, En se basant sur le séquençage de la région nucléotidique des espaces internes transcrits, (ITS1 et ITS2) de l'ADN ribosomal.

➤ **Section *Pachybasium* Sacc.**

Cette section inclut des espèces possédant des conidiophores fortement ramifiés qui sont regroupés en fascicules ou en pustules compactes, et possédant des branches relativement courtes et trapues portant des phialides gonflées en verticilles denses. Nous pouvons citer comme exemple : *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. virens* Miller, Gidder et Foster.

➤ **La section *Hypocreanum* sect. nov.**

Cette section accomode les *Trichoderma*, formes anamorphes des *Hypocrea* qui ont une conidiogénèse diffuse, des conidiophores faiblement branchés, et des phialidescylindriques à subulées. Les sections *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* ont été créés et décrits par Bissett (1984) et Doi et *al.* (1987) respectivement.

La forme téléomorphe des espèces de *Trichoderma* appartient à l'ordre des *Hypocreales*, au genre *Hypocrea*, mais certaines espèces de *Trichoderma* ont été rattachées au genre *Podostroma* P. Karst. et *Sarawakus* Boedijn. Depuis 1860 plusieurs espèces du genre *Hypocrea* ont été cultivées et leur anamorphe *Trichoderma* sont décrits (Samuels, 1996).

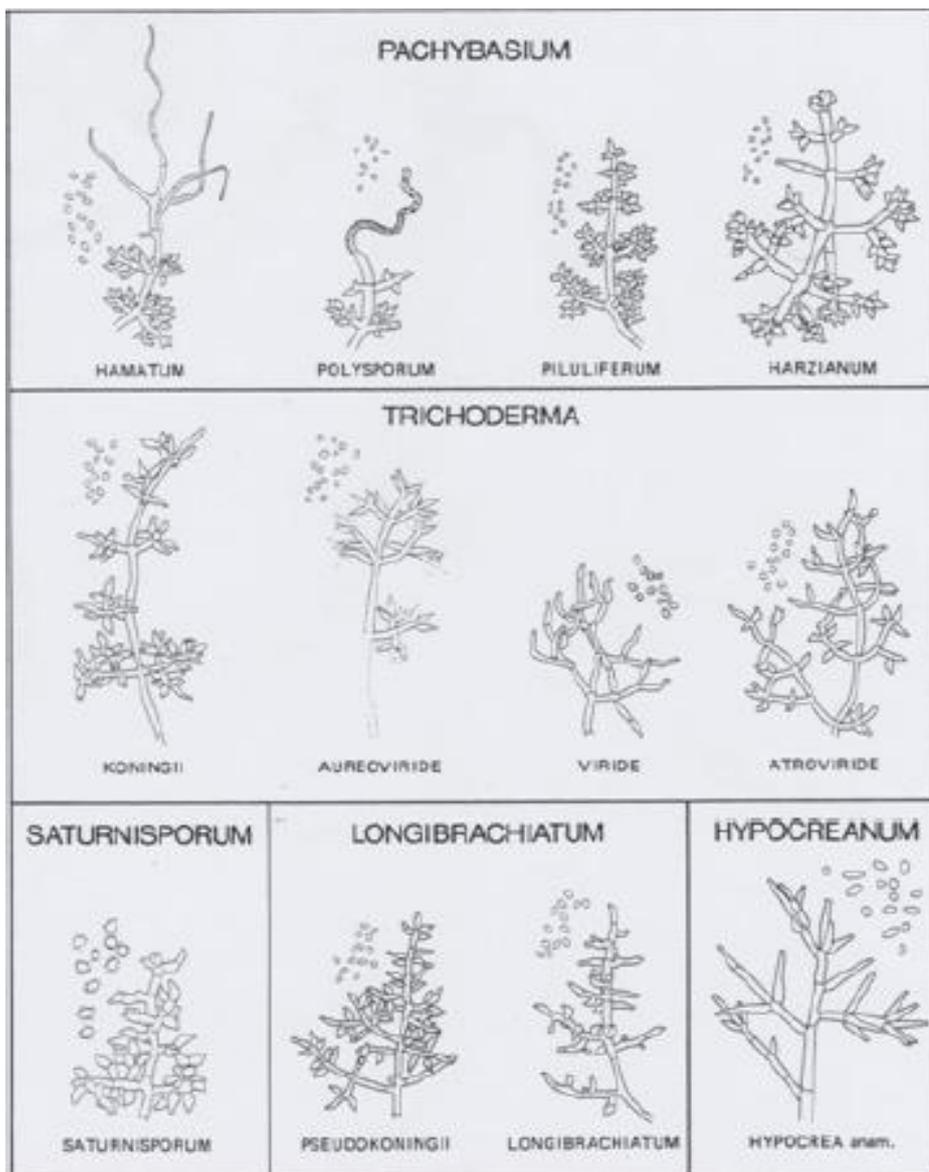


Figure. 4 : Les cinq sections de *Trichoderma* reconnus par Bissett (1991).

Des études de métabolites secondaires, utilisés comme méthodes taxonomiques supplémentaires à la morphologie notamment qui ont montrées une grande diversité dans ce genre (Okuda *et al.*, 1982). Les caractéristiques physiologiques peuvent éventuellement fournir un système utile pour l'identification. Les profils isoenzymiques ont été utilisés comme un outil taxonomique efficace (Leuchtman *et al.*, 1996 ; Samuels *et al.*, 1994).

2.1.2. Approche moléculaire

Bissett (1991b) considère que la détermination des espèces chez le genre *Trichoderma* ne peut être résolue sans une intégration des études morphologiques, moléculaires et le cycle de vie du champignon. L'intégration de ces méthodes est accomplie pour la première fois par Samuels *et al.*, (1998) pour résoudre l'identification des 10 espèces de la section *Longibrachiatum* basée sur la morphologie des téléomorphes et l'anamorphe et (ITS) de l'ADN ribosomal.

Le développement de nouvelles méthodes et des techniques d'analyse phylogénétique des séquences a permis d'identifier des nombreuses espèces de *Trichoderma* sur la base de gènes multiples. Kullnig-Gradinger *et al.* (2002) ont élaboré la première classification phylogénétique « multigène » de *Trichoderma*, basée sur la région ITS1/ITS2, le gène endochitinase 42 (ECH42) et le gène du facteur d'élongation de la traduction (tef1) Elle a été portée sur 47 espèces distinctes de *Trichoderma*. Samuels *et al.* (2002) ont utilisé la région ITS de l'ADNr et le gène tef1 pour étudier la systématique de deux espèces très proches, *T. harzianum* et *T. aggressivum* Samuels & W. Gams.

En 2005, le nombre des espèces d'*Hypocrea* / *Trichoderma* s'affiche à 88 espèces distinctes, dont 14 sont reconnues comme des holomorphes, 49 téléomorphes et 25 anamorphes (Druzhinina et Kubicek, 2005). En 2006, le genre est déjà composé de plus de 100 espèces définies phylogénétiquement (Druzhinina *et al.*, 2006). Bissett *et al.* (2015), ont publiés une liste de 256 noms acceptés d'espèces de *Trichoderma* contre lesquels ils doivent être protégés.

2.2. Ecologie et habitat

Grace 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), ceci peut être attribuable à la nature concurrentielle des espèces de *Trichoderma* et à la possibilité de production de divers métabolites (Gams et Bissett 1998).

Les espèces de *Trichoderma* sont considérées comme un élément majeur de la biodiversité des sols et qui sont principalement associées aux racines des plantes. Cependant, des études récentes ont révélé que les espèces *Trichoderma*, non seulement sont associées aux racines des plantes, mais elles persistent également à l'intérieur des tissus racinaires (Xia et al., 2011 ; Mulaw et al., 2013 ; Cummings et al., 2016).

Trichoderma se retrouve couramment dans le sol, sur le bois et sur les débris des végétaux (Dubos, 1986). Les espèces de *Trichoderma* sont favorisées par la présence d'un grand nombre de racines, qu'elles colonisent aisément. Presque tous les sols tempérés et tropicaux contiennent 101-103 propagules de *Trichoderma*/g du sol (Harman et al., 2004).

Les champignons, qui sont capables de coloniser la surface du système racinaire (Racines et parfois des tissus internes), de stimuler la croissance et de protéger les plantes, sont considérés comme des PGPF « Plant Growth-Promoting Fungi ». Les champignons PGPF peuvent stimuler la défense de la plante et présenter une activité antagoniste envers différents agents phytopathogènes, tout en stimulant directement la croissance de la plante (Whipps, 2001 ; Bent, 2006). Ils peuvent être des champignons filamenteux comme le *Trichoderma* voire même des levures également appelées PGPY « Plant Growth-Promoting Yeasts » (Harman et al., 2004 ; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

Davet (1983) a trouvé que le taux de propagules le plus faible est observé dans le cas des teneurs en eau les plus basses. Mais ce phénomène est réversible, si le sol est déshydraté, le taux de propagules revient à sa valeur d'origine. La température n'a aucun effet sur les populations du *Trichoderma* dans le sol, si la teneur en eau est maintenue constante.

Les *Trichoderma* sont omniprésents dans le sol, très remarquable par des besoins nutritionnels minimaux, une croissance rapide, une sporulation abondante et une capacité d'utiliser divers substrats. Les *Trichoderma* jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, d'origine naturelle et xénobiotique, en attribuant une biofertilisation aux sols. Ils sont bien connus pour leur production d'enzymes de dégradation comme les Chitinases et cellulases impliquées dans la lyse du mycélium de nombreux champignons. Avec de telles qualités, les *Trichoderma* sont des agents de lutte biologique et stimulateurs de la croissance des plantes (Klein et Eveleigh, 1998).

2.3. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique

L'utilisation d'une méthode de lutte biologique ne cherche pas à prévenir une éradication totale de l'espèce envahissante mais son objectif est d'en réduire suffisamment et durablement les effectifs pour les amener en dessous d'un seuil de nuisibilité, écologiquement et/ou économiquement acceptable. L'objectif principal est donc de rétablir un équilibre durable entre l'agent de lutte biologique et l'agent pathogène (Suty, 2010).

La capacité de *Trichoderma* spp. à contrôler des agent phytopathogènes du sol est connue depuis le début du XXIème siècle, mais ce n'est qu'à partir de 1990 que ce champignon a été commercialisé sous forme de biopesticide, ce qui indique la somme considérable de connaissances qu'il faut acquérir avant de permettre l'utilisation pratique d'une telle méthode de lutte (Lepoivre, 2003).

En sus, *Trichoderma* spp. Est utilisé commercialement pour la production des cellulases et d'autres enzymes qui dégradent les polysaccharides complexes. Il est fréquemment employé dans les industries alimentaires et textiles (Harman, 2006).

Les travaux de Baker (1988) ont montré que certaines souches de *Trichoderma* semblaient exercer une action stimulatrice sur la croissance de certaines plantes, selon ce contexte, Lynch et al. (1991) ont étudié l'effet de *Trichoderma* sur la croissance de la laitue et son aptitude à lutter contre *Rhizoctonia solani* Kühn et *Pythium ultimum* Trow. Ils ont aussi démontré l'effet de certaines souches de *Trichoderma* sur la croissance de la laitue et la germination des graines en absence de tout agent pathogène.

En 1952, Wood signalait l'efficacité de *Trichoderma viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue (Caron, 2002).

Son antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un mycoparasitisme, ou par une antibiose. Ces mécanismes peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement (Lepoivre, 2003).

2.4. Mode d'action de *Trichoderma* sp

2.4.1. Antibiose

Chez les espèces de *Trichoderma*, l'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu qui repose sur la production de métabolites secondaires de nature diverse, exerçant un effet inhibiteur voir létal sur l'agent pathogène (Vinale *et al.*, 2007).

La production des métabolites secondaires par les espèces de *Trichoderma* est d'environ 180 métabolites appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset 1998

; Reino et al. 2008). Ces composés ont été caractérisés et qui peuvent être classés en trois catégories : des composés volatiles, des composés diffusibles et des peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam 1991).

L'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles est produit par certaines espèces de *Trichoderma*, à savoir *T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*, qui jouant un rôle dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń et al. 2013).

Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autreshydrolases, sont parmi les métabolites diffusibles impliqués dans le mécanisme d'antibiose exercé par *Trichoderma* (Howell, 2003 ; Harman et al., 2004 ; Eziashi et al., 2006 ; De Castro et al., 2010).

Les *Trichoderma* peuvent aussi secréter des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antiviraux. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les viridines, trichotoxines A et B, trichorovines (synthétisées par *T. viride*) ; trichorzianines A et B, trichorzines (synthétisés par *T. harzianum*) ; koningine, acide koningique, trichokonines (synthétisés par *T. koningii*) ; longibrachines (synthétisé par *T. longibrachiatum*) et autres (Vinale et al. 2006 ; Reino et al., 2008 ; Andrabi et al., 2011).

2.4.2. Compétition pour les nutriments et l'espace

La compétition pour les éléments nutritifs et l'espace est un des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Tronsmo et Hjeljord, 1998).

La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) à partir de la solution du sol (Yedidia et al., 2001).

Sivan et Chet (1989) ont démontré que la compétition pour les nutriments est le principal mécanisme utilisé par *T. harzianum* pour contrôler *Fusarium Oxysporum f. sp. melonis*.

2.4.3. Induction de la résistance systémique (ISR)

L'induction de la résistance systémique (**Fig.5**), dans les plantes par la synthèse des substances chimiques par *Trichoderma* a été démontré dans les années 90s (Elad, 1996 ; Enkerli et al., 1999).

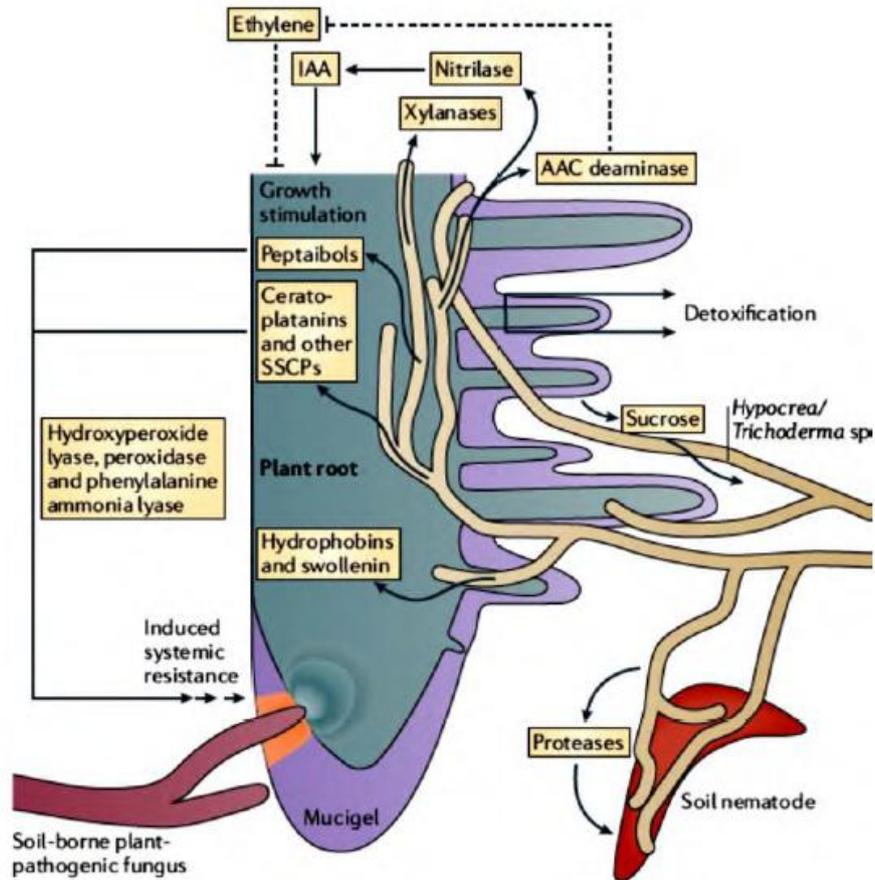


Figure. 5 : Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de *Trichoderma* (Irina et al., 2011).

Cette résistance est soit localisée ou systémique. La reconnaissance entre la plante et le *Trichoderma* aboutit à la synthèse des phytoalexines (molécules fongitoxiques) (Howell, 2003 ; Shoresh et al., 2005).

Les *Trichoderma* sont capables d'éliciter les mécanismes de défense de la plante par la synthèse de l'enzyme ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) et l'apophytormone AIA (acide indole-3-acétique). La biosynthèse de l'éthylène (hormone végétale) augmente en réponse à l'ACC désaminase. Le développement et le système de défense de la plante sont liés entre eux par un réseau de voies de signalisations hormonales dont les acteurs centraux dans la défense sont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Viterbo et al., 2010 ; Hermosa et al., 2012).

Les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes. Certaines souches établissent une colonisation au niveau des surfaces racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité et la résistance au stress biotique et abiotique ainsi que l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman *et al.*, 2004).

Les *Trichoderma* influencent sur la croissance des plantes en synthétisant des phytohormones comme l'AIA et en améliorant le contenu du sol en nutriments par la solubilisation du phosphate et d'autres éléments nutritifs comme le Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ et Zn qui peuvent être non disponibles dans certains sols ou bien existent sous forme non assimilable pour les plantes (Altomare *et al.*, 1999 ; Gravel *et al.*, 2007).

2.4.4. Le mycoparasitisme

Le mycoparasitisme implique comme une première étape une reconnaissance de l'agent pathogène par l'agent de lutte (**Fig.6**). Le *Trichoderma* perçoit la présence de son hôte et commence à développer des hyphes en direction de ceux du pathogène par chimiotropisme. La reconnaissance se manifeste par une adhésion de *Trichoderma* spp aux parois de son hôte suivi par l'enroulement des hyphes du mycoparsite sur ceux de l'agent phytopathogène. Par la suite, une pénétration à l'intérieur des hyphes du pathogène se fait suite à des sécrétions d'enzymes de dégradation de la paroi de l'hôte comme les chitinases et les glucanases. Ce phénomène est suivi par une dissolution du cytoplasme. Le contenu cellulaire de l'hôte est rapidement lysé par la mise en jeu d'enzymes extracellulaires telles que la protéase et la lipase (Howell, 2003 ; Harman *et al.*, 2004 ; Dubey *et al.*, 2007).

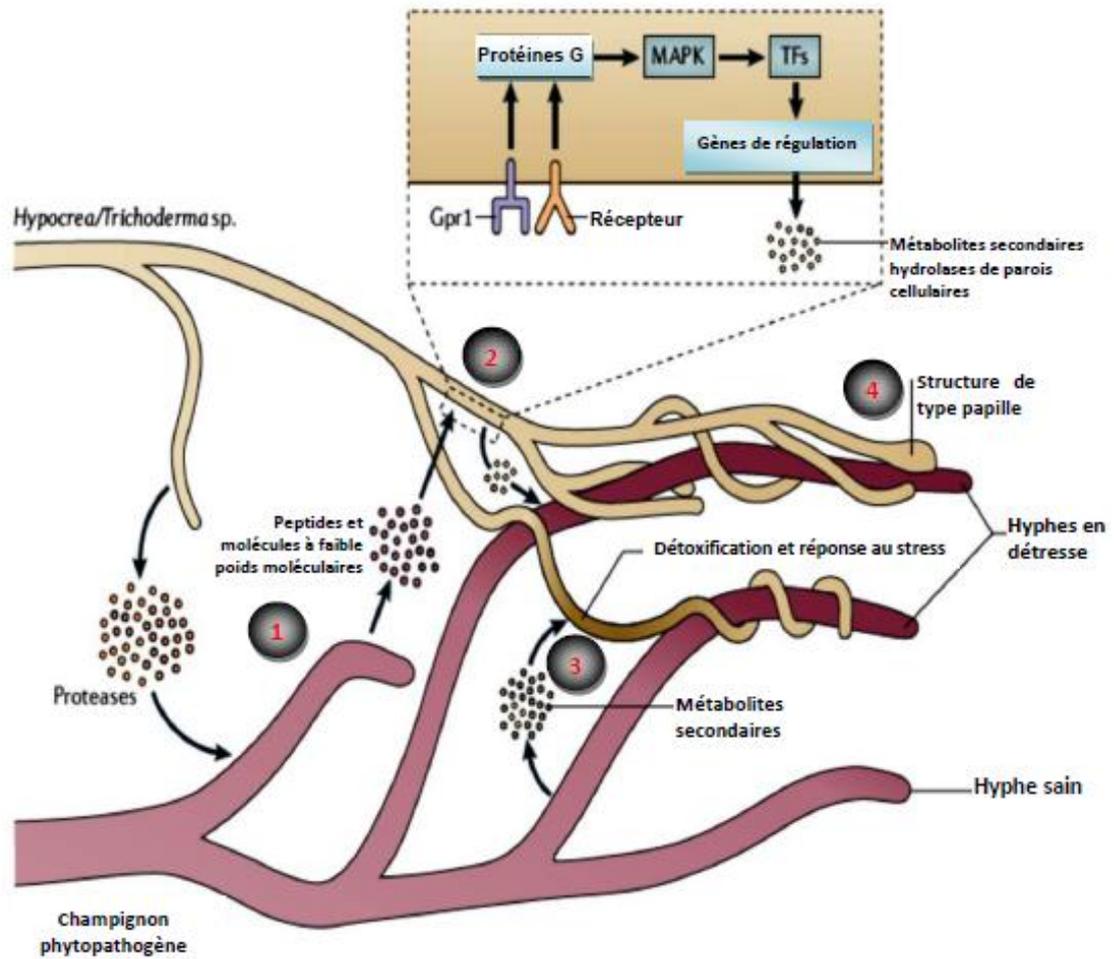


Figure.6 : Mécanisme de mycoparasitisme des *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011)

Chapitre II

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de mycologie du département des Biotechnologies de l'Université de Blida1. L'intérêt de cette étude s'est porté sur l'évaluation de l'effet de l'exposition de quelques variétés de vigne à deux Agent fongiques, agents phytopathogènes responsables du dépérissement de la vigne, appartenant à la famille des Botryosphaeriaceae et un antagoniste appartenant à la famille des Hypocraceae *Trichoderma sp.*

Notre étude est constituée de quatre parties :

✓ La première partie est consacrée à : (i) une analyse enzymatique, (ii) une analyse chimique des extraits de filtrats de culture par Fourier Transformed Infra Rad Spectroscopy) *FTIR et (iii)* une analyse chimique par chromatographie en phase gazeuse liée à la spectrométrie en masse *GC-SM* de la souche fongique antagoniste testée, *Trichoderma sp.*

✓ La seconde partie comprend un essai *in vitro* qui détermine l'activité antagoniste de *Trichoderma sp* vis-à-vis trois agents pathogènes impliqués dans le dépérissement de la vigne.

✓ La troisième partie comprend, un test de pathogénicité a été appliqué sur des boutures de 7 cépages et deux porte greffe, dans le but de déterminé : les réponses physiques au stress à travers l'évaluation de la taille des lésions.

✓ La quatrième partie comprend un essai *in situ* à l'égard d'un champignon pathogène pour confirmer l'activité antagoniste et la phytostimulation directement sur des boutures de 7 cépages et deux porte greffe,

1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué d'un matériel fongique et d'un matériel végétal.

1.1. Matériel fongique :

Les souches fongiques sélectionnées sont : l'agent antagoniste *Trichoderma sp*, famille des Hypocraceae et trois espèces responsables du dépérissement de la vigne appartenant au genre *Botryosphaeria* (**Tab.2**). L'identité de ces espèces a été confirmée sur la base des caractères morphologiques et culturelles d'une clé d'identification (Phillips, 2002), et une analyse moléculaire en utilisant des amorces universelles : Internal Transcribed spacer (ITS 1 et ITS 4).

En raison de l'absence des fructifications dans les cultures fongiques obtenues durant l'incubation des espèces appartenant au genre *Botryosphaeria*, nous avons utilisé des disques mycéliens à partir des cultures âgées de 5 jours.

Tableau.2 : Caractéristiques des souches fongiques

Espèces	Hôte	Identification	Provenance
<i>Trichoderma sp</i>	Agrume, Washignton navel	Ammad et al, 2015	Blida
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Vigne	Ammad et al, 2014	Médéa
<i>Botryosphaeria sp 1</i>	Vigne	Ammad et al, 2014	Blida
<i>Botryosphaeria sp 2</i>	Vigne	Ammad et al, 2014	Tipaza

1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de sept cépages de vigne destinés pour la production du raisin de table : le Cardinal, Red Globe, Datal, Victoria, Muscat d'Italie, Alphonse lavalloé, Debouki et deux porte-greffe (SO4, 1103P) (**Tab.3**). Ces variétés, provenant d'une pépinière multidisciplinaire de la wilaya de Blida, agréée par le centre national de contrôle et de certification (CNCC) d'Alger.

Tableau 3 : Différentes caractéristiques des cépages

Régions	Blida
Localité	Larbaâ
Cépages	Cardinal, Red Globe, Datal, Victoria, Muscat d'Italie (ou Muscat Italia), Alphonse lavalloé, Debouki
Porte-greffes	SO4, 1103P
Age (an)	1an-2ans

2. Milieux de culture

Divers types de milieux de culture sont mis en œuvre. Par rapport aux besoins expérimentaux, Milieu PDA (Potato Dextrose Agar), Milieu PDB (Potato Dextrose Broth) : dont leurs compositions sont indiquées dans l'Annexe 1.

3. Purification des champignons

La purification de ces champignons pathogènes et antagonistes a été réalisée après plusieurs repiquages par des transplantations successives des disques mycéliens des isolats testés sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA). L'incubation des cultures fongiques a été effectuée à une température de 25°C pendant 7 jours.

4. Etude de l'activité enzymatique de la souche antagoniste

La souche antagoniste a été testée pour sa capacité et son potentiel de produire des enzymes comme la chitinase, la cellulase, la protéase, l'amylase, la ligninase et la lipase.

La production de chaque enzyme a été détectée sur un milieu de culture solide contenant un substrat spécifique comme unique ou principale source de carbone.

Pour chaque test enzymatique, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre provenant de culture âgée de 7 jours de *Trichoderma* est déposée au centre d'une boîte de Pétri. L'activité enzymatique a été évaluée en mesurant le halo transparent ou la zone hydrolysée autour des colonies après une période d'incubation de 2 à 5 jours, ce qui indique la production de l'enzyme testée (Ceska, 1971 ; Federici, 1982).

4.1. Production de chitinase :

La méthode utilisée pour mesurer la production de chitinase est décrite par Kamala et Indira Devi (2011), Cette activité a été déterminée sur le milieu de détection de la chitinase (Annexe 1), additionnée du pourpre de bromocrésol (colorant indicateur de pH) ; Le pH a été ajusté à 4,7.

Après 2-3 jours d'incubation à 25 °C, un changement de couleur du jaune au violet pourpre peut être vu dans la région d'utilisation de la chitine autour de la colonie de *Trichoderma* suite à l'augmentation du pH. L'intensité de la couleur et le diamètre de la zone de couleur pourpre sont pris comme des critères pour déterminer la production de chitinase.

4.2. Production de cellulase :

Pour désigner la capacité de la souche fongique antagoniste à produire la cellulase, une source de cellulose est utilisée : la *carboxy-méthyl-cellulose* (CMC) pour la détermination de l'activité d'enzyme endoglucanase (Kausar et *al.*, 2010).

Un disque de 6 mm de *Trichoderma* est ensemencé sur le milieu de culture (Annexe 1) Puis les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 7 jours. La production de l'endoglucanase (CMCase) a été observée après une inondation des boîtes avec 0,1% de rouge Congo (1 mg/ml) pendant 15 min. La solution de rouge Congo a été ensuite déversée et les boîtes ont été ensuite traitées par une inondation avec 1M de NaCl (58.44g of NaCl dans un volume de 1 litre de l'eau distillé stérile) pendant 15 min. La dégradation de la cellulose a été visualisée sous forme d'une zone claire autour de la colonie fongique (Abe et *al.*, 2015).

4.3. Production de protéase :

La production de la protéase a été testé en utilisant le milieu au lait écrémé (Annexe 1). Après incubation à 28 °C pendant 3 à 4 jours, la souche de *Trichoderma* avait une activité protéase démontré par une zone claire autour de la colonie (Berg et *al.*, 2002).

4.4. Production d'amylase

La production de l'amylase a été déterminé par l'utilisant d'un milieu gélosé à base d'amidon (Annexe 1) (Abe et *al.*, 2015). Après incubation à 28 C pendant 72 heures, les boîtes ont été traitées avec 5 ml de solution iodée (1% KI ; 0,5% I₂ (v/v)) pendant 15 minutes.

La production des amylases a été évaluée par la formation d'un halo jaune clair autour de la colonie.

4.5. Production de ligninase :

La dégradation enzymatique de la lignine par la polyphénol oxydase a été testée en utilisant le milieu d'acide tannique (Annexe 1) (Thomann et *al.*, 2002). La formation d'un pigment brun foncé qui entoure le point de repiquage a été utilisé comme indicateur du polyphénol oxydase (PPO) sur le milieu d'acide tannique après 4 jours d'incubation à 28 °C (Mukhlis et *al.*, 2013).

4.6. Production de lipase

Un milieu de culture contenant du Tween 20 (polyoxy-éthylène-sorbitan-monolaurate) comme un substrat lipidique (Annexe 1) a été utilisé pour déterminer la production de lipase (Abe et *al.*, 2015). Le Tween 20 a été autoclavé séparément et ajouté au milieu stérile avant de le couler dans les boîtes. Après 2 à 5 jours d'incubation à 28 °C, les boîtes ont été incubées à 4°C pendant 12 h, avant la lecture des résultats (Hankin et Anagnostakis, 1975).

La production des lipases a été évaluée par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies.

4.7. Production de phytohormone : l'acide indolylacétique (AIA)

La production de l'AIA est testée sur milieu liquide PDB additionné de tryptophane (5g/l) (Annexe 1) (Bric et *al.*, 1991). Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures *Trichoderma* incubées à 30°C/96 h. Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm/20min. un ml (1ml) du surnageant est additionné de 2 ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique 35% et 1ml de FeCl₃ à 0.5 M).

5. Analyse chimique des extraits de filtrat de culture de *Trichoderma sp.* par FTIR (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)

5.1. Préparation des extraits de filtrat de culture de *Trichoderma sp.*

Des disques de 5mm sont prélevés à partir de culture âgées de 7jours, après sontensemencés dans des flacons de 500 ml contenant 250 ml du milieu liquide potato-dextrose (Annexe 1). Et incubés dans un incubateur /agitateur à 120 rpm et à une température de 30±2°C pendant 14jours.

Le filtrat a été récupéré à travers un papier Watman n°03. Un volume de 50ml est additionné 50 ml de butanol. Cette opération a été répétée deux fois. Puis le filtrat est transvasé dans un ampoule à décantation pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. Les deux phases sont récupérées et le butanol dans la phase aqueuse est évaporé par l'utilisation d'un bain mari réglé à la température de 60°C. (Mu'ayad AL-Obaidy et *al.*,2010)

5.1. Analyse par FTIR

Pour détecter les groupes fonctionnels des métabolites secondaires, une analyse spectral FTIR, La Spectroscopie Infrarouge a Transformée de Fourier (Ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy) ; elle est réalisée à partir de filtrats de *Trichoderma sp.* En utilisant le logiciel Opus de TENSOR II /BRUKER.

Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon.

Le TENSOR II est un spectromètre compact optimisé pour un haut rendement énergétique combiné à un grand compartiment échantillon. L'optique est protégée et étanche et réalisée dans un matériau rigide de très haute qualité.

6. Activité antagoniste *in vitro* :

L'action antagoniste de *Trichoderma sp.* sur la croissance mycélienne des pathogènes est réalisé selon trois méthodes :

- Une confrontation directe
- Une confrontation indirecte (à distance) à travers la production des substances volatiles
- Une analyse *in vitro* de l'effet de filtrat de culture de *Trichoderma sp.*

6.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture :

La technique utilisée est décrite par Sivan et Chet (1989). Cette technique consiste à co-ensemencer dans une même boîte de Pétri contenant un milieu PDA deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre) (**Fig. 7**) à 3 cm de distance l'une de l'autre et à équidistance du centre de la boîte prélevée à partir de cultures de *Trichoderma* et l'agent pathogène (âgées de 7 jours) (Annexe 1).

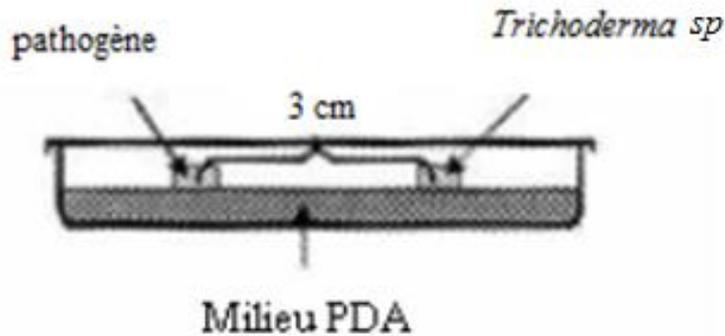


Figure.7 : Schéma montrant la confrontation à équidistance du l'agent pathogène et de *Trichoderma sp.* sur milieu PDA

Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes sont par la suite incubées à l'obscurité (25°C) pendant six jours, avant la lecture des résultats qui consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste au bout de 6 jours après l'inoculation et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement.

L'inhibition de *Trichoderma* testée est évalué par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon (Data *et al.*, 2004) :

$$(\%) \text{ inhibition} = \frac{(R \text{ témoin} - R \text{ test})}{R \text{ témoin}} \times 100$$

R témoin : distance radiale max de la croissance du champignon pathogène.

R test : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

Après 6 jours d'incubation la région d'interface a été observée sous microscope optique en vue d'étudier le mode d'action du *Trichoderma*.

6.2. Production des substances volatiles (Confrontation à distance) :

Cette méthode décrite par Dennis et Webster (1971), consiste à repiquer l'antagoniste et l'agent pathogène dans deux boîtes séparées contenant le milieu PDA

A partir des cultures âgées de 7 jours, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et placée séparément au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (**Fig. 8**). Après l'enlèvement des couvercles aseptiquement, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Trichoderma* en bas et le pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par du para film pour éviter les pertes en substances volatiles. Trois répétitions sont réalisées.

Pour le témoin, le même assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes.

Le fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène. Trois répétitions sont été maintenues pour chaque traitement. Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

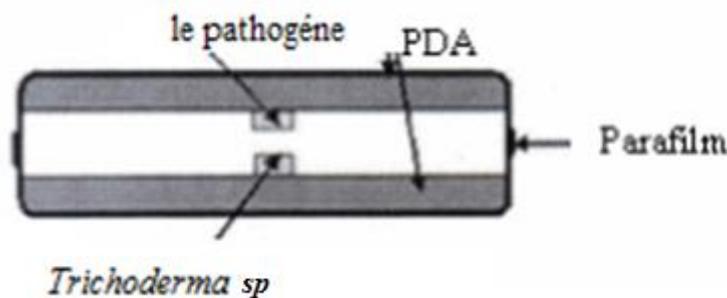


Figure.8 : Schéma montrant la confrontation à distance

6.3. Analyse *in vitro* de l'effet de filtrat de culture de *Trichoderma*

L'action *in vitro* de filtrats de culture de *Trichoderma* a été évaluée sur la germination des spores des *Botryosphaeriaceae*

Le filtrat de culture de *Trichoderma* a été préparé selon la méthode décrite par Dennis et de Webster (1971). Deux pastilles gélosées de *Trichoderma* (6 mm de diamètre) prélevées d'une culture âgée de 7 jours sontensemencées dans 100 ml de milieu liquide PDB (Annexe 1) et incubées à 25°C pendant 15 jours sous agitation. Les cultures sont ensuite centrifugées à 8000 rpm pendant 10 mn.

Le surnagent recueilli est filtré à travers un filtre millipore de 0,22 µm de diamètre. Le filtrat est ajouté aseptiquement, à l'aide d'une seringue stérile, au milieu PDB pour obtenir une concentration de 50% (v/v).

Les filtrats sont additionnés au milieu de culture en surfusion à raison de 2 ml par 10 ml de PDA soit 20% v/v. Dans chaque boîte de Pétri, trois disques d'agar colonisés par les pathogènes sont repiqués d'une façon équidistante. Les cultures témoins sont additionnées d'un même volume de milieu PDB. La croissance radiale des colonies des pathogènes est enregistrée après 5 jours d'incubation à 25°C (Anith,1997).

7. Activité antagoniste *in Situ* :

Les essais d'antagonisme *in situ* ont été effectués avec une souche fongique (*Trichoderma* sp), via à vis de *Botryosphaeria Dothidea* des essais d'interaction ont été réalisés *in situ* sur des boutures de vigne (variétés : le Cardinal, Red Globe, Datal, Victoria, Muscat d'Italie, Alphonse lavalée, Debouki et deux porte-greffe (SO4, 1103P)).

La méthodologie utilisée est inspirée de celle utilisée par Moral et *al*, (2010) pour confirmer l'action inhibitrice des agents antagonistes sur la pathogénicité des *Botryosphaeriaceae* associés au dépérissement de la vigne.

7.1. Méthodologie

Des boutures de 14 à 16 cm de long et de 10 à 15 mm de diamètre, ont été prélevées à partir de sept variétés de vigne et deux porte-greffes. Un total de 250 boutures a été inoculé avec espèces testées.

La surface de l'écorce a été désinfectée avec de l'éthanol au point d'inoculation situé au milieu de chaque bouture. A l'aide d'un scalpel, des incisions ont été réalisées pour enlever l'écorce (**Fig.9**).

Des pastilles de 10 mm de diamètre de mycélium des espèces fongiques testées ont été prélevées en utilisant une pipette Pasteur puis déposées au niveau des plaies déjà provoquées sur le matériel végétal. Cinq répétitions ont été effectuées (**Fig.9.a, b**).

Après inoculation, les incisions ont été enveloppées avec du coton stérile humide puis scellées avec du para film. Les boutures ont été mis dans des pots contenant de l'eau distillée stérile (**Fig.9.c, d**). Afin d'éviter le dessèchement, les boutures ont été enveloppées avec des sachets en plastiques durant 04 à 05 jours.

7.2. Le Protocol utilisé

- 5 plants pour les témoins (non inoculés).
- 5 plants inoculés par le champignon pathogène.
- 5 plants pour la combinaison entre le pathogène et l'antagoniste.

Tous le travail est effectué dans les conditions aseptiques (à côté du bec bunsen, matériels stérilisées).

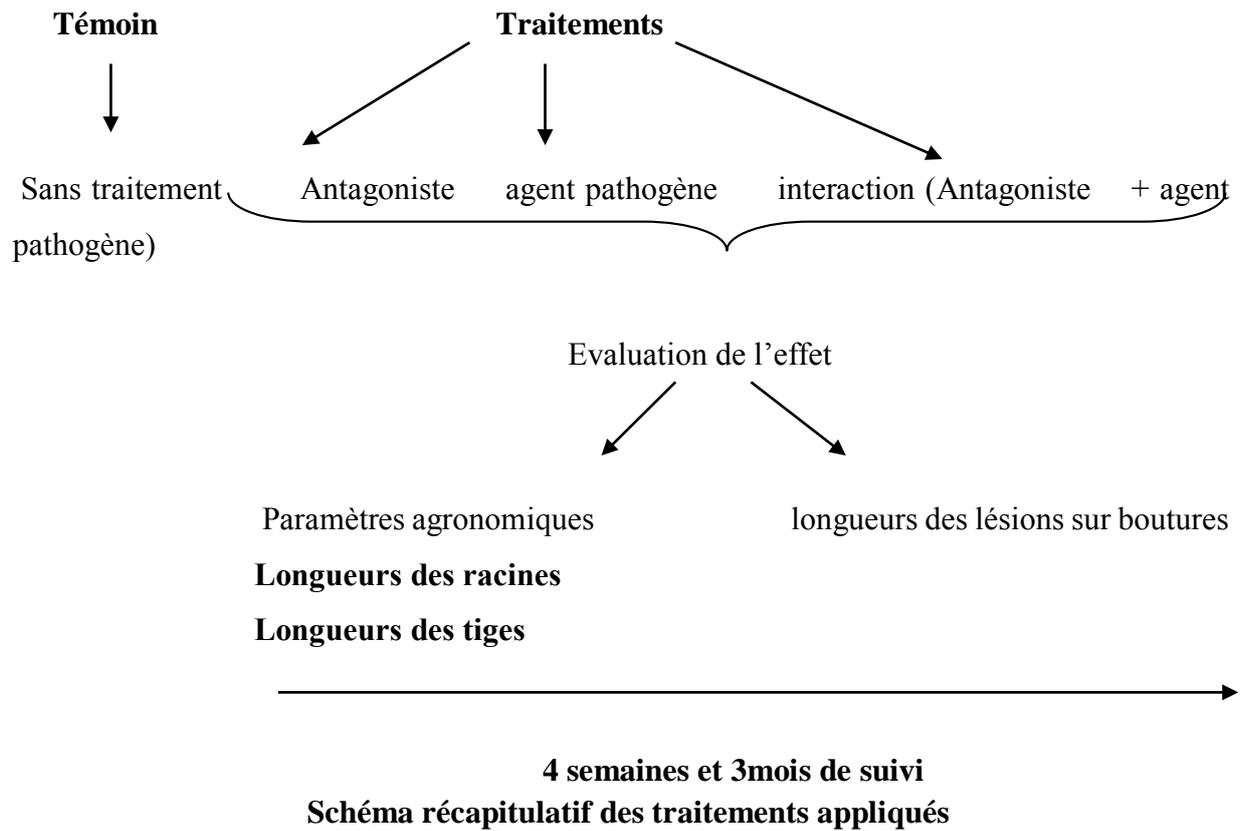


Figure.9 : a) Incision de la bouture à l'aide d'un scalpel. b) Inoculation des mycéliums pathogène ou de pathogène et l'antagonistes. c) Incisions enveloppées avec du coton stérile humide. d) Incisions scellées avec du parafilm.

7.3. Evaluation des taux d'infection

Une semaine après inoculation, des observations quotidiennes a été réalisés, qui vise à rechercher des nécroses au niveau du matériel végétal inoculé. Le suivi s'est basé sur la mesure des lésions sur papier millimétrique.

7.4. Paramètres agronomiques

7.4.1. Longueur de partie aérienne (H)

La longueur de la bouture est la distance qui sépare le collet de la tige, jusqu'au bourgeon terminal. Elle est mesurée à l'aide d'un mètre ruban et exprimée en centimètre (cm).

7.4.2. Longueur du système racinaire (LR)

A la fin de l'expérimentation, chaque bouture est récoltée individuellement. Elles sont ensuite coupées au niveau des racines. La longueur de la racine principale est mesurée à partir de la fin de l'extrémité basale du collet jusqu'à l'extrémité du chevelu racinaire en utilisant une règle graduée et exprimée en centimètre (cm).

7.5. Ré-isolément

La technique utilisée est décrite par Péros et Berger (1994) et Péros (2005), pour confirmer la responsabilité des agents pathogènes dans l'apparition des lésions. Les buchettes ont été découpées à trois niveaux des boutures inoculées (au point d'incision et à environ deux centimètres de part et d'autre de l'incision), avec trois répétition pour chaque test.

Les buchettes ont été plongées dans un pilulier contenant une solution d'hypochlorite de sodium à 8° pendant 10mn. Et ensuite sont rincées par trois bains consécutifs avec l'eau stérile et séchées sur du papier buvard stérile.

Les coupes des buchettes sont rafraîchies à l'aide d'un scalpel, puis les buchettes sont disposées par cinq dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA (Fig. 4), scellées avec du para film et mises à incuber à 25°C à l'obscurité.

L'observation des boites se fait tous les deux à trois jours et à chaque fois qu'une colonie se développe.

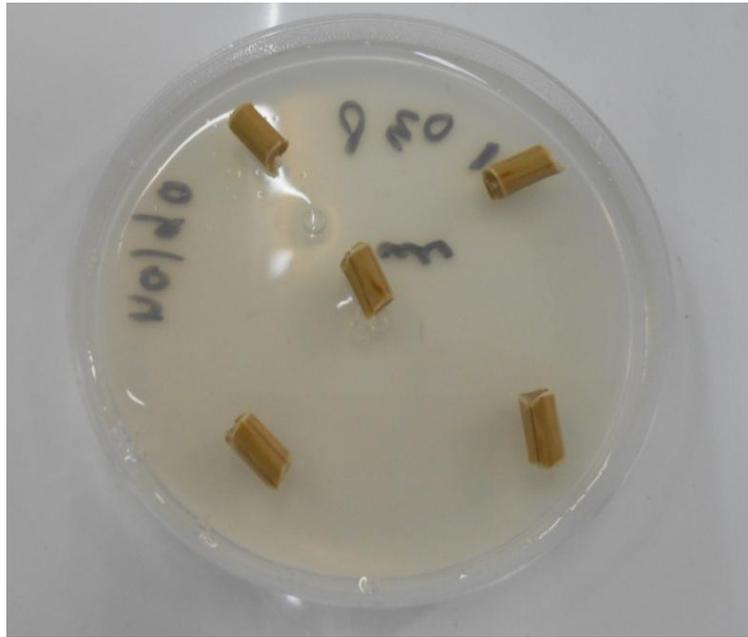


Figure.10 : Ré-isolément des souches pathogènes sur milieu PDA.

8. Analyse statistique

La présence des nécroses a été utilisée comme indicateur de la pathogénicité ainsi une analyse de la variance a été effectuée en utilisant le modèle linéaire général (G.L.M). Les variétés de de la vigne, les phytopatogenes et l'antagoniste sont considérées comme des facteurs indépendants. La détection des différences entre les réponses de chaque espèce a été réalisée à travers le test de Tukey.

Les paramètres de croissance sont exprimés en moyenne \pm la déviation standard ($M \pm DS$), à partir du nombre de répétition technique est égal à 10. La comparaison des moyennes est effectuée par l'analyse de la variance à 1 facteur (G.L.M) et le test de TUKEY en utilisant le logiciel SPSS (v 20.0, Microsoft), à un seuil ($p < 0.005$).

Chapitre III

Résultats et Discussion

1. Etude macroscopique et microscopique des isolats

L'étude est basée sur les caractères cultureux (aspects du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du mycélium) sur milieu PDA et sur les caractères microscopiques (forme des conidiophores et des phialides).

1.1. Caractérisation macroscopique de l'agent antagoniste

Trichoderma a poussé sous forme des cercles concentriques réguliers, les colonies sont compactées en touffe. Un mycélium aérien, blanc se forme d'un cercle, très abondant, vigoureux, épais et dense, *Trichoderma* se développe facilement *in vitro* avec un rythme de croissance élevé qui varie entre 3 jours à 4 jours.

Trois jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite (**Fig. 11.A**).

- **Caractérisation microscopique :**

Nous avons observé un mycélium composé d'hyphes septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés et ils portent des phialides et ces derniers portent des conidies (**Fig. 11. B, C, D, E**).

1.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des Botryosphaeriaceae

Sur le milieu PDA, le champignon présente des colonies régulières d'un aspect cotonneux. Le mycélium est blanc au départ, quelques isolats ont viré vers le gris clair pour devenir gris très foncé à noirâtres vers un vert olive (**Fig.12. A**). Le mycélium est aérien avec présence de cordons, il devient très dense avec le temps et présente une croissance rapide. Sans utilisation de colorant l'observation microscopique montre que le mycélium jeune est hyalin, cloisonné, coloré d'un brun très foncé à noir (**Fig.12. B**).

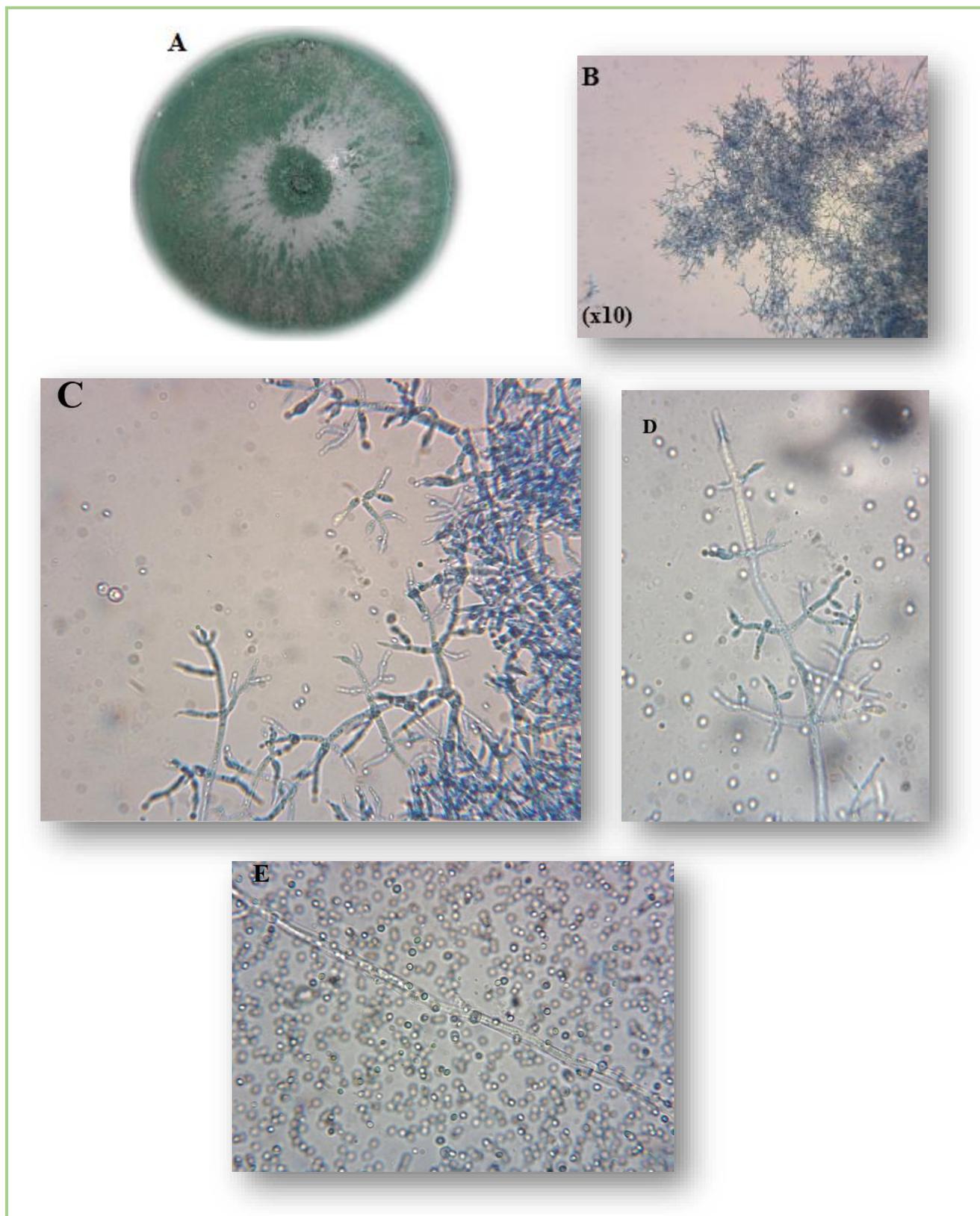


Figure.11 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B, C, D, E) de *Trichoderma* sp,
C : phialides contenant des phialospores (x40)
D : conidiophore (x 40)
E : spores (x40)

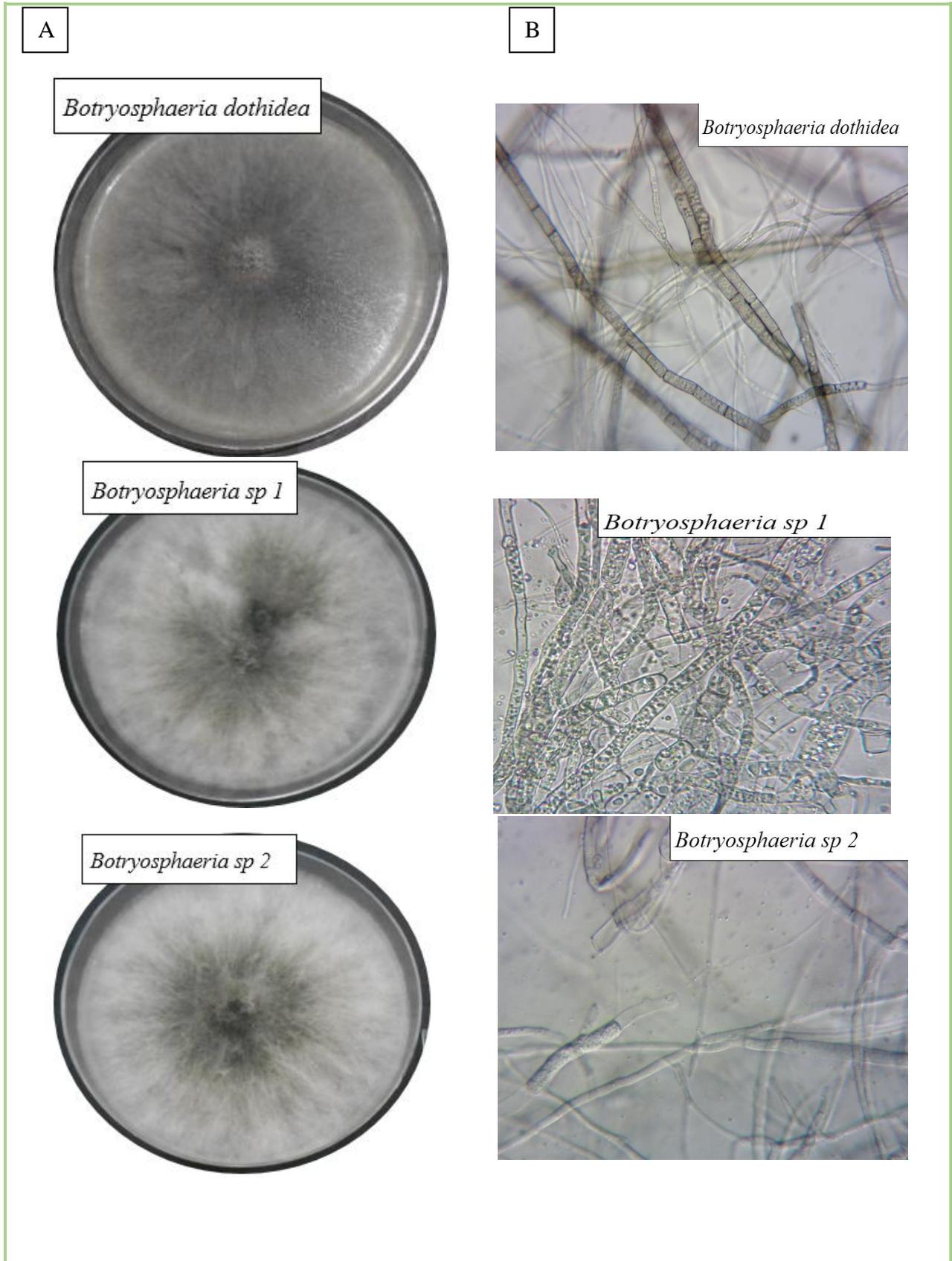


Figure.12 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) des *Botryosphaeriaceae*.

Discussion

A cause de la difficulté dans la description des caractères morphologiques chez les *Trichoderma*, l'identification basée uniquement sur la morphologie des espèces n'est pas suffisante. En effet, des confusions peuvent être faites entre les espèces lorsque des critères uniquement morphologiques sont considérés dans la taxonomie des *Trichoderma* (Lieckfeldt et al., 2001).

Pour notre cas, la description générale du conidiophore, ses ramifications ainsi que la disposition des phialides correspondent à la section *Longibachiatum*. Néanmoins à l'intérieur de la section *Longibrachaitum*, basée sur la morphologie des phialides, il est très délicat de distinguer entre les espèces *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride* et *T. pseudokoningii*, en particulier entre les deux dernières (Bissett, 1991a).

Basée uniquement sur les caractères morphologiques tels que, l'aspect des colonies, la morphologie du conidiophore, ses ramifications, ainsi que la morphologie des phialides et leur mode de groupements, l'identification des espèces chez le genre *Trichoderma* est problématique. Il est difficile de trancher, car ces caractères peuvent présenter de grandes variations à l'intérieur de la même espèce. L'identification de l'espèce avec précision nécessite des analyses complémentaires.

Pour le cas de l'agent pathogène, les caractères utilisés pour différencier entre les genres des *Botryosphaeriaceae* sont largement reliés sur les caractéristiques morphologiques des ascospores (Barr 1987, 1989, Hsieh & Chen 1994, Phillips et al. 2008), et surtout les formes conidiennes (Crous et al., 2006, Phillips et al., 2008).

Les caractères les plus informatifs sont les caractéristiques conidiales telles que la pigmentation, l'épaisseur de la paroi et la septation, mais d'autres caractères tels que la présence ou l'absence de paraphyses dans les conidiomata peuvent être utiles.

2. L'activité enzymatique de l'antagoniste

2.1. Production de la chitinase

L'isolat antagoniste (*Trichoderma*) a été testé pour sa capacité de dégrader la chitine colloïdale comme seule source de carbone. Après une période d'incubation de *Trichoderma sp* de 3 à 5 jours à 25 °C, nous avons constaté :

- Une bonne croissance de *Trichoderma* (60mm de diamètre) ce qui indique l'utilisation de la chitine colloïdale comme seule source de carbone (**Fig.13.B**).
- Apparition d'une zone de couleur jaune claire autour de la colonie (**Fig.13.A**).
- Aucun changement vers le violet pourpre n'a été remarqué.

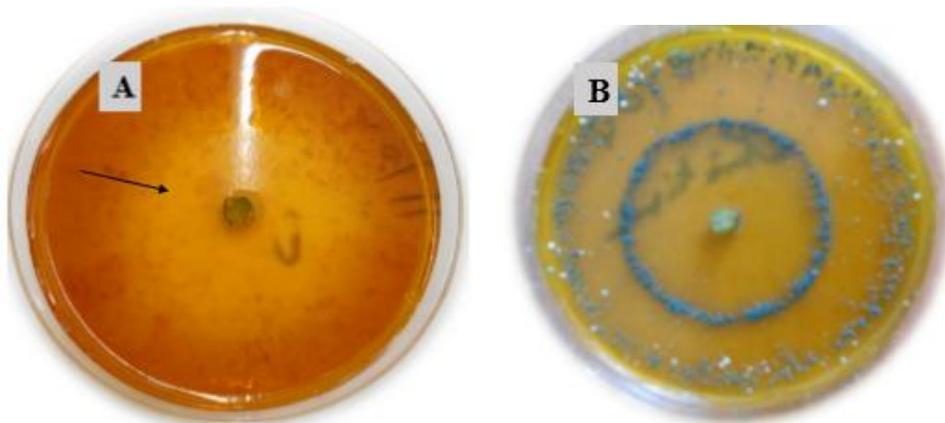


Figure.13 : Production de la chitinase par *Trichoderma sp*.

(A) appa rition d'une couleur jaune claire dans la région de dégradation de la chitine autour de la colonie après 3 jours d'incubation à 25  C.

(B) développement et croissance après 5 jours d'incubation.

2.2. Production de la cellulase

La capacité de *Trichoderma* a synthétisé l'enzyme endoglucanase a été détectée par le développement du champignon sur le milieu de base Carboxy-méthyl-cellulose (CMC) comme seul source de carbone (**Fig. 14**).



Figure.14 : Production d'endoglucanase après 7 jours d'incubation à 28°C.

2.3. Production de l'amylase

Après l'incubation de *Trichoderma* à 28°C pendant 72h, nous avons soulevé :

- La présence d'un halo jaune clair autour de la colonie avec un faible diamètre de la zone hydrolysée par l'isolat (**Fig. 15**).

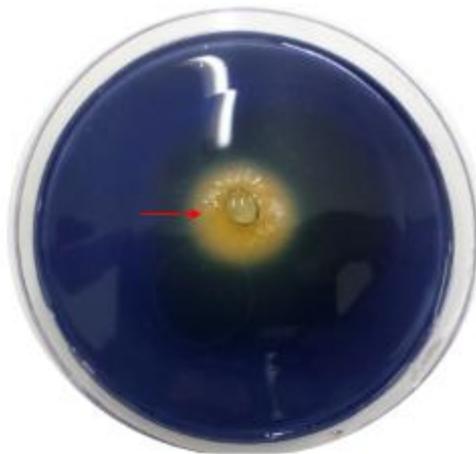


Figure.15 : Production des amylases par *Trichoderma* après 3 jours d'incubation à 28°C:

Formation d'un halo jaune claire autour de la colonie.

2.4. Production de la ligninase

Ce test nous a permis d'enregistré :

- La formation d'une zone brune foncée autour de la colonie après 2 jours d'incubation (**Fig.16.A et B**), sur milieu à base de l'acide tannique de 23mm.



Figure.16 : Formation d'un halo brun-foncé autour des colonies de *Trichoderma* caractéristique de la production de ligninase après 2 jours d'incubation.

2.5. Production de la lipase

Dans ce test nous avons utilisé un milieu de culture contenant le Tween 20 comme un substrat lipidique, les résultats ont montré une activité lipolytique suite à l'apparition d'un halo blanc opaque autour de la colonie de *Trichoderma* qui indique sa capacité de dégrader le Tween 20 avec un diamètre de 55mm de la zone hydrolysée (**Fig.17**).



Figure.17 : Production de la lipase traduite par la présence d'un halo blanc opaque autour de colonie de *Trichoderma*.

2.6. Production de la protéase

Après 3 jours d'incubation à 28°C *Trichoderma* a pu hydrolyser la caséine, nous avons noté la formation d'une grande zone claire de 82 mm sur gélose au lait écrémé (**Fig.18**). Cette zone claire indique la présence de protéase.



Figure.18 : Apparition d'un Halo transparent autour de la colonie de *Trichoderma* sp.

2.7. Production des phytohormones AIA (Acide indole acétique)

Les résultats de ce test ont montré que l'antagoniste testé est capable de produire l'AIA, car nous avons remarqué la manifestation d'une couleur rose-rouge après quelques minutes de l'ajoute du réactif de **Salkowski** para rapport au témoin (**Fig. 19**).

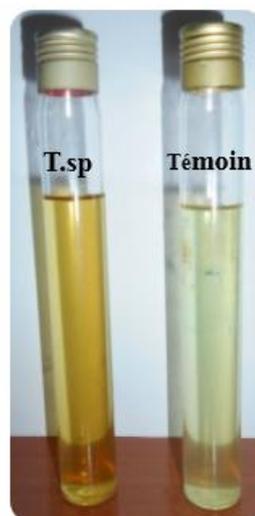


Figure.19 : Production d'AIA sur le milieu liquide additionné de tryptophane.

Discussion

Les résultats obtenus indiquent la présence d'une activité enzymatique chez l'agent antagoniste testé ce qui montre la présence d'un potentiel mycoparasitaire sur les agents pathogènes, sachant que le mycoparasitisme implique la synthèse d'un mélange riche en enzymes hydrolytiques. D'après Harman et *al.* (2004), les protéases, les chitinases et/ou des enzymes glucanases ont une fonction en décomposant les polysaccharides, la chitine, et les β -glucanes qui sont responsables de la rigidité des parois des cellules fongiques, détruisant ainsi l'intégrité de la paroi cellulaire.

La protéase et la cellulase produites par *Trichoderma spp.* Jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, la minéralisation des éléments nutritifs et la promotion de la croissance des plantes (Lima et *al.*, 1998).

Les espèces de *Trichoderma* ont été signalées comme des producteurs d'amylase (Calistru et *al.*, 1997). L'amidon est disponible et largement répandu dans la nature, d'où la production d'amylase pourrait être utile pour dégrader l'amidon présent à des produits simples tels que le glucose pour maintenir leurs besoins métaboliques (De Marco et *al.*, 2003).

D'après Barbosa et *al.* (2001), la production d'amylase par *Trichoderma spp* est en partie responsable de la croissance rapide des antagonistes sur le milieu gélosé PDA.

Au vu de nos résultats, la capacité de dégrader la lignine, par le changement de couleur sur le milieu de culture à base de l'acide tannique qui été utilisé comme un indicateur de la synthèse polyphénol-oxydase.

La synthèse de la polyphénol-oxydase est nécessaire pour la dépolymérisation de la lignine. Bien que la lignine est structurellement différente de l'acide tannique, ce dernier est utilisé comme un indicateur des polyphénol-oxydases et pour sélectionner les microorganismes ligninolytiques (Thormann et *al.*, 2002 ; Mukhlis et *al.*, 2013).

Tenant en considération, que l'AIA est un régulateur de croissance important chez la plante, para rapport à nos résultats obtenus sur l'AIA (Acide indole acétique) *Trichoderma spp* est en mesure de produire de l'AIA.

La production de ce régulateur de croissance est d'ailleurs souvent associée à la stimulation de la croissance par les micro-organismes bénéfiques (Patten et Glick, 1996 ; 2002 ; Vassilev et *al.*, 2006, Gravel et *al.*, 2007).

Dans ce partie les résultats obtenus ont mis en évidence la capacité de *Trichoderma spp* à synthétiser l'hormone de croissance AIA, et à produire des enzymes lytiques à des différentes valeurs.

La production de l'AIA par l'isolat fongique peut être considérées comme étant des PGPF (Plant Growth Promoting Fungi).

Globalement, d'après nos résultats, nous supposons que l'utilisation de l'isolat fongique *Trichoderma spp* peuvent démontrer *in vivo* une bonne protection des plantes contre les pathogènes suite à leurs capacités à sécréter des enzymes lytiques et un bon développement des plantes due à ça potentialité à synthétiser l'AIA.

Pour accomplir les systèmes de lutte biologique compétent, la compréhension des modes d'action des *Trichoderma sp* par rapport à leurs activités antagonistes sur les pathogènes des plantes est indispensable. Dont les modes d'action des agents de lutte biologique sont généralement difficiles à déterminer *in vivo*. Pour cela, les essais biologiques *in vitro* sont des outils très utiles pour déterminer les mécanismes possibles ou les plus probables.

3. Analyse chimique d'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma sp* par Spectroscopie Infrarouge a Transformée de Fourier (Ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)

L'analyse spectral par FTIR a montré la présence des plusieurs pics d'absorption et de Transmittance (Annexe n°2), des extraits de filtrat de culture de *Trichoderma sp* des deux phases, une aqueuse (Tab. 4) et une organique (Tab.5).

Tableau .4 : Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma sp* de la phase aqueuse.

Groupes chimiques	Longueurs d'ondes (bandes d'absorption)	Types de Liaisons chimiques
Alcanes	3000-2840	C-H
Alcènes	1667-1640	C=C
Alcynes	2260-2100 1370-1220	C≡C
Aromatiques mononucléaires	600-420 900-675 1300-1000 1500-1400 2000-1650	C-H
Hydrocarbures aromatiques monocycliques	1300-1000 1500-1400 600-420	C-H
Alcools et phénols	3550-3200 1390-1330 1200-1000 1420-1330 769-650	C-O, O-H
Alcools secondaires	1124-1087	C-O
Ethers Vinyliques	1225-1200	C-O
Cétones	1870-1540	C=O
Acides carboxyliques	1720-1706	C=O
Acides carboxyliques	3300-2500	O-H
Esters	1300-1000	C-O
Esters aliphatiques saturés	1730-1715	C=O
Anhydrides cycliques	952-909 1299-1176	C-O
Amides	3350-3180	N-H
Amides tertiaires	1680-1630	C=O
Lactames	1750-1700	C=O
Lactames	800-700	N-H
Amines primaires aliphatiques (pures)	3400-3300	N-H
Amines aromatiques	1342-1266	C-N
Isonitriles(RNC)	2280-2000	R-N≡C

Nitrates(RONO ₂)	1660-1625 870-833	N-O
Nitrites (RONO)	1680-1650 850-750	N=O
Composés soufrés	1350-1300 1370-1335	S=O
Composés halogènes	850-550	C-Cl
Composés silicium	950-800 3700-3200 1000-800	Si-H SiO-H Si-F
Composés phosphorés	750-650	P-C
Composés phosphorés aliphatiques	1050-970	P-O-C
Composés phosphorés aromatiques	1260-1160	P-O-C

Tableau. 5 : Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma sp* de la phase organique.

Groupes chimiques	Longueurs d'ondes (bandes d'absorption)	Types de Liaisons chimiques
Alcynes	2260-2100	C \equiv C
Aromatiques mononucléaires	600-420 1300-1000 1500-1400	C-H
Alcools et phénols	3550-3200 1200-1000	C-O, O-H
Cétones	1870-1540	C=O
Hydrocarbures aromatiques monocycliques	1300-1000 1500-1400 600-420	C-H
Esters	1300-1000	C-O
Amides	3350-3180	N-H
Amides tertiaires	1680-1630	C=O
Amines primaires aliphatiques (pures)	3400-3300	N-H
Isonitriles(RNC)	2280-2000	R-N \equiv C
Nitrates(RONO ₂)	1660-1625 870-833	N-O
Composés silicium	3700-3200	SiO-H

L'analyse par FTIR des extraits de filtrat de culture de *Trichoderma sp* a montré environ 25 groupes chimiques selon les bandes d'absorption.

Les bandes les plus importantes, et les plus riches en information, dans les spectres de composés aromatiques apparaissent dans la plage des basses fréquences entre 900 et 675 cm^{-1} . Ces fortes bandes d'absorption proviennent des déformations angulaires hors du plan, des liaisons C-H du cycle.

La vibration de déformation dans le plan de la liaison O-H apparaît globalement entre 1 420 et 1330 cm^{-1} . Dans les alcools primaires et secondaires, la déformation de la liaison O-H dans le plan est couplée avec les vibrations de balancement de la liaison pour donner deux bandes : le premier absorbe vers 1420 cm^{-1} , l'autre vers 1 330 cm^{-1} . Ces bandes ne sont que peu caractéristiques. Les alcools tertiaires, pour lesquels aucun couplage ne peut avoir lieu, présentent une bande unique dans cette région, la position de celle-ci dépend du degré de formation des liaisons hydrogène.

Les spectres des alcools et des phénols pris à l'état liquide, présentent une large bande d'absorption entre 769 et 650 cm^{-1} due à la déformation hors du plan du groupe O-H lié.

Les anhydrides cycliques affichent des bandes vers 952- 909 et 1299-1 176 cm^{-1} .

Les bandes d'absorption des nitrites sont parmi les plus fortes que l'on puisse observer dans les spectres IR.

Notre étude a mis en évidence la présence des vibrations d'élongation C-O : Les cétones, les aldéhydes, les acides carboxyliques, les esters carboxyliques, les lactones, les halogénures d'acides, les anhydrides, les amides et les lactames qui présentent une forte bande d'absorption pour l'élongation du groupe entre 500 et 3300 cm^{-1} . Sa position relativement constante, sa forte intensité et son indépendance relative vis-à-vis des bandes interférentes font d'elle une des bandes les plus faciles à reconnaître dans les spectres IR. Par référence à d'autres résultats, Won Chew et al 2012 a montré que l'analyse infrarouge de transformation de Fourier (FTIR) réalisée de *Trichoderma sp*. A révélé que *Trichoderma sp*. Possède des groupes fonctionnels tels que des groupes amino et hydroxyle.

Les bandes caractéristiques principales enregistrées comprenaient : une large bande de vibration d'élongation O-H et N-H obtenue autour de 3413 cm^{-1} pour la liaison intermoléculaire d'hydrogène (groupes OH liés à H) attribuée à des groupes phénoliques. Les hydrogènes de méthylène (-CH₂-) ont donné naissance à deux bandes d'élongation aliphatiques C-H.

Un pic prononcé à 1652 cm^{-1} pourrait être attribué à C = C aromatique, C = O et / ou C = O de cétones conjuguées ou à un élongation C = N d'amide. La déformation C-H asymétrique de méthyle a été observé à 1458 et 1053 et 1034 cm^{-1} pourraient être attribués à l'élongation C-O d'alcool, de sulfoxydes, de glucides ou de substances similaires aux polysaccharides.

L'étude de Wei Li et al 2015, a prouvé dans Les spectres IR la présence des signaux de carbonyle (-C = O) visibles à $1655,07\text{ cm}^{-1}$; vibrations d'élongation de la liaison C-H dans -CH₃ visible à $2966,75\text{ cm}^{-1}$, $2871,14\text{ cm}^{-1}$ et $3005,30\text{ cm}^{-1}$; Une vibration de déformation de la liaison C-H dans -CH₃ à $1364,34\text{ cm}^{-1}$, $1311,12\text{ cm}^{-1}$ et $1244,07\text{ cm}^{-1}$; Et des vibrations de déformation de la liaison C-H d'hydrocarbures oléfines à $921,47\text{ cm}^{-1}$ et $878,69\text{ cm}^{-1}$.

4. Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma sp* *in vitro* vis-à-vis des agents phytopathogènes (*Botryosphaeriaceae*)

4.1. Confrontation directe sur milieu de culture entre les pathogènes et l'antagoniste.

Les résultats obtenus après un repiquage simultané de *Trichoderma* et des espèces phytopathogènes appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont montré ;

- Les espèces phytopathogènes occupent une croissance diamétrale allant de 3,2cm à 4,23 cm après six jours d'incubation ; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne allant de 50 % à 62,35 %, selon l'espèce testée (**Fig.20**)
- Une croissance plus rapide de *Trichoderma* par rapport aux isolats testés (**Fig.21. A et B**).
- Un mycoparasitisme très net a été noté (**Fig.22**).
- Une sporulation en masse a été soulevé (**Fig.23**)
- Apparition de grandes vacuoles à l'intérieur du mycélium de pathogène (**Fig. 24**)
- Présence de petites vésicules de *Botryosphaeria sp2* (**Fig.25**)
- Cette étude a mis en évidence l'effet inhibiteur de *Trichoderma* testé sur les trois espèces de *Botryosphaeria*.

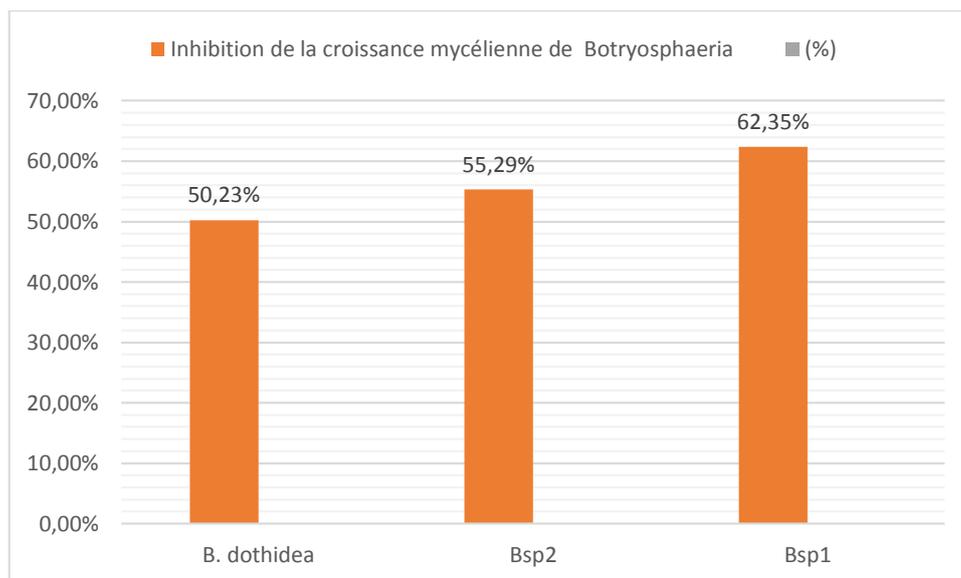


Figure. 20 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des *Botryosphaeria* par *Trichoderma sp* après six jours d'incubation à 25 °C

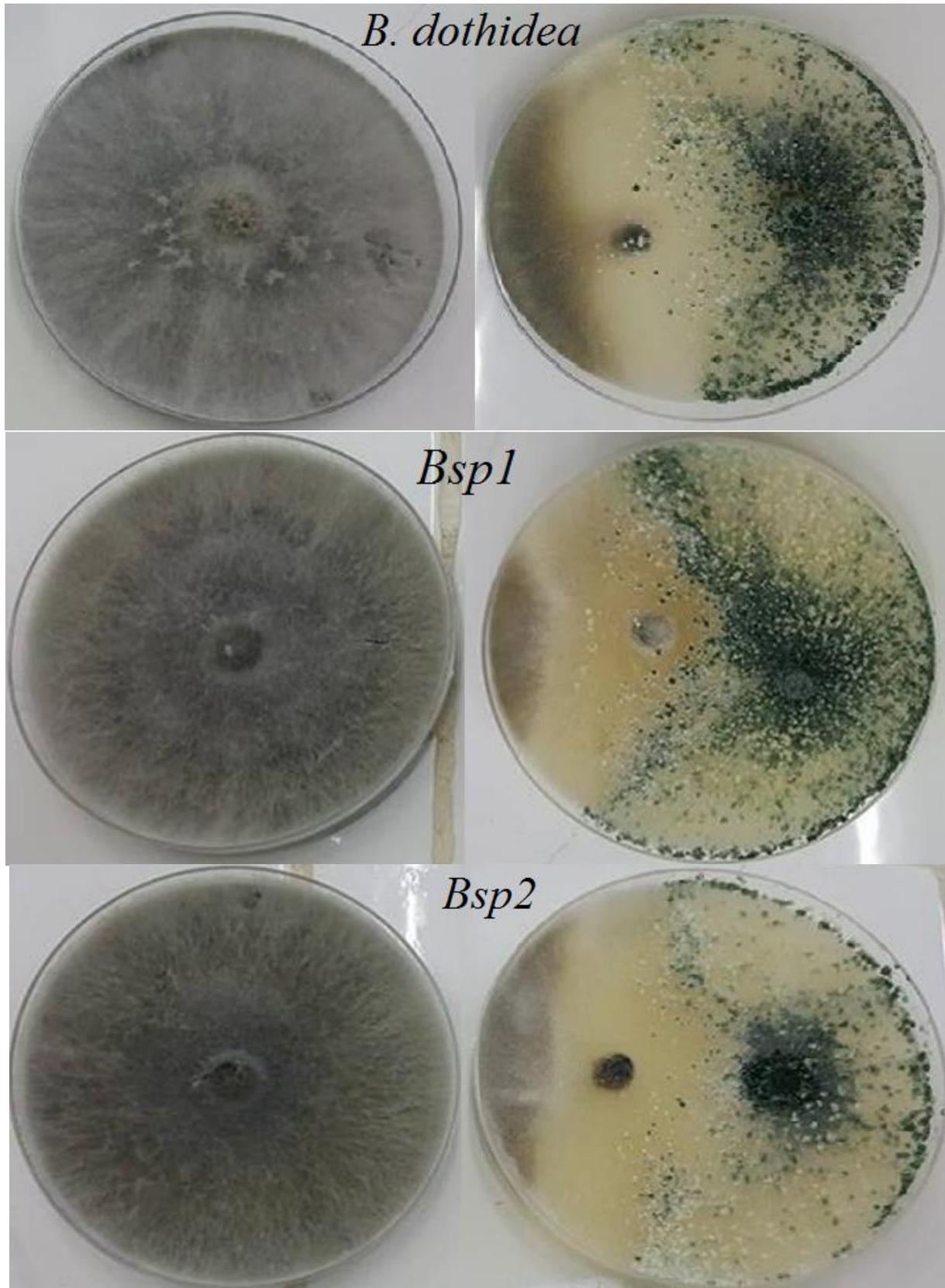


Figure.21 : Inhibition de la croissance mycélienne des *Botryosphaeria* (B), en comparaison avec leur témoin(A), par confrontation directe avec *Trichoderma* sp. Après 6 jours d'incubation à 25°C.



Figure. 22 : Action hyperparasitaire de l'isolat *Trichoderma sp* montrant une surcroissance et une sporulation abondante sur la colonie de pathogène.

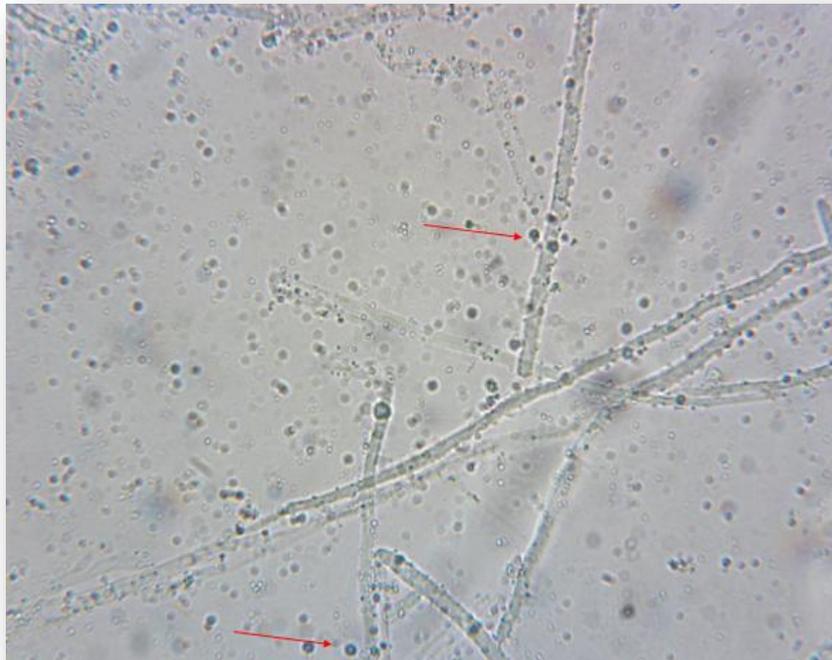


Figure. 23 : Sporulation de *Trichoderma sp* en masse sur les hyphes de *Botryosphaeria dothidea* (x40)



Figure.24 : Apparition de grandes vacuoles à l'intérieur du mycélium de pathogène (x40)



Figure.25 : la lyse Présence de petites vésicules de *Botryosphaeria sp2* (x40)

4.2. Confrontation à distance

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de *Trichoderma* exercé sur les trois espèces pathogènes testées en mesurant les diamètres (mm) des colonies de ces deux dernières cultivées en présence ou en absence de l'antagoniste.

- Au bout de 6 jours de confrontation, nous avons observé des faibles réductions du diamètre des colonies des agents fongiques testés par rapport au témoin (non traité) (**Fig.26**).
- Un changement de couleur du mycélium a été observé chez *B. dothidea* par rapport au témoin non traité, ce qui indique une sécrétion des substances volatiles par *Trichoderma* en présence du pathogène.

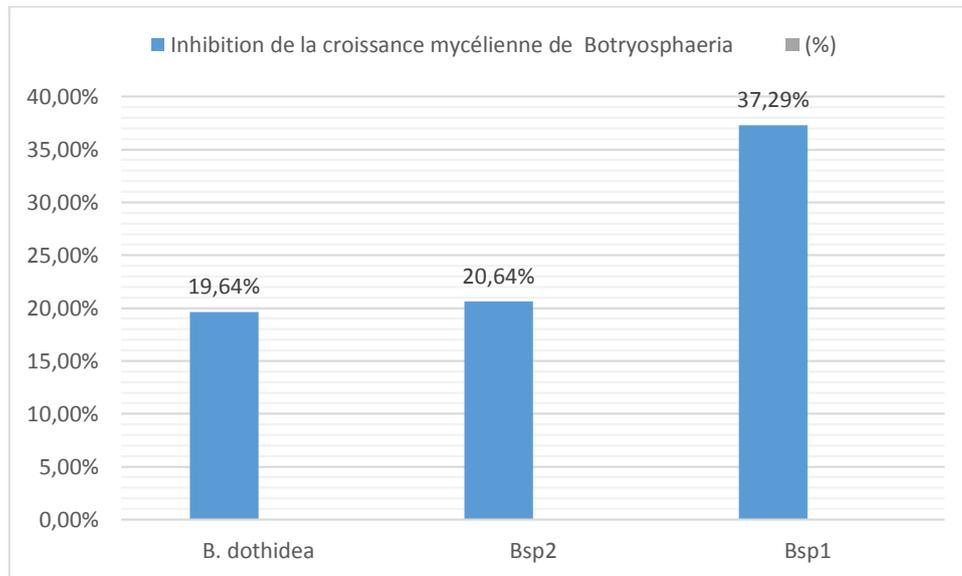


Figure.26 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* par *Trichoderma sp* après six jours d'incubation à 25 °C

4.3. Analyse *in vitro* de l'effet des filtrats de culture de *Trichoderma*

L'action de filtrat de culture de *Trichoderma sp* a été évaluée *in vitro* sur le milieu liquide PDB afin de déterminé l'effet inhibiteur des substances non-volatiles (diffusibles).

Le filtrat de culture de l'agent antagoniste testé a montré un effet inhibiteur de la croissance mycélienne des pathogènes(**Fig.27**). Cette inhibition est d'autant plus importante chez l'espèce pathogène *Botryosphearia sp 1*.

Les métabolites libérés dans le milieu de culture par l'isolat antagoniste ont inhibé efficacement la croissance mycélium des Botryosphaeriaceae à plus de 58,13%,50%, 52,62%, 51% pour, *Botryosphearia sp1*, *Botryosphearia sp2* et *Botryosphearia dothidea*, respectivement (**Fig.28**).

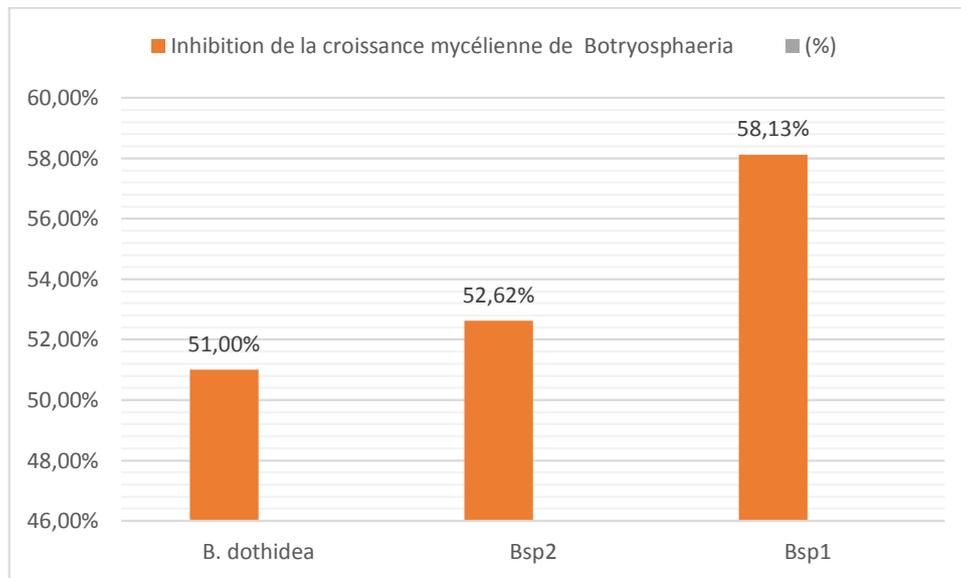


Figure.27 : Pourcentage d'inhibition de mycélium des pathogènes par le filtrat de culture de *Trichoderma* après 5jours d'incubation

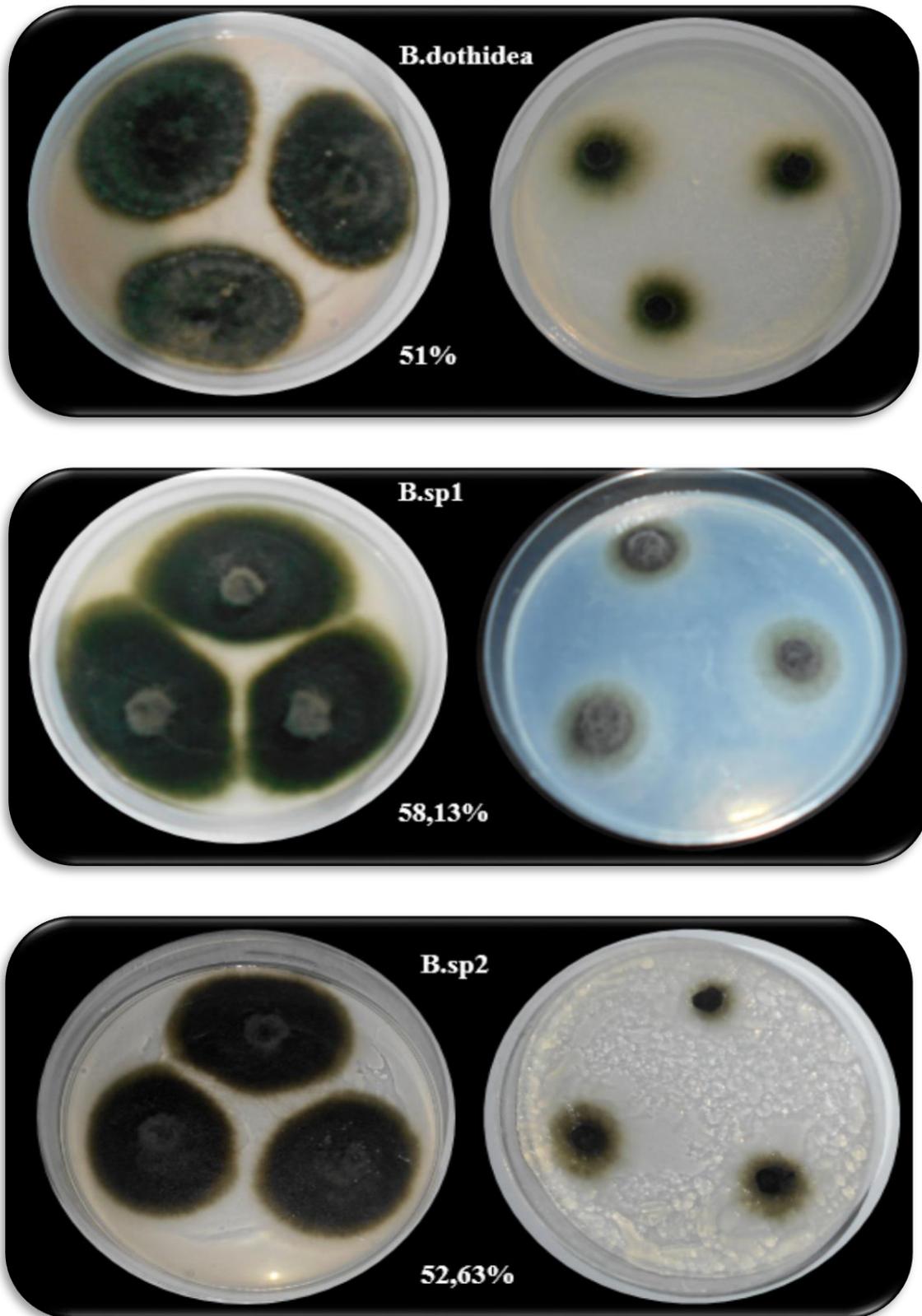


Figure. 28 : pouvoir inhibiteur de filtrat de culture de *Trichoderma sp* sur le mycélium des pathogènes après 5 jours d'incubation à 25 °C.

Discussion

Dans cette étude *Trichoderma* a inhibé la croissance mycélienne des pathogènes, sur le site de contact en formant une barrière qui empêche le développement des pathogènes.

La confrontation entre *Trichoderma spp* et *B. dothidea* après 72 heures et sans aucun contact entre les mycéliums antagoniste et pathogène, a montré une zone d'inhibition de la croissance du pathogène accompagné par le changement de la couleur du milieu.

L'effet des filtrats de l'agent antagoniste sur la croissance des pathogènes varie selon l'espèce fongique testée, nous avons enregistré un maximum d'inhibition pour l'espèce *Botryosphaeria sp1*.

Le phénomène d'antagonisme observé, où *Trichoderma spp.* n'a pas permis la croissance des colonies de *Botryosphaeria* confirme les phénomènes de compétition, d'antibiose et d'hyperparasitisme signalés pour *Trichoderma spp.* (Hoitink et al., 2006).

Le mycoparasitisme généralement implique des changements morphologiques, tels que l'enroulement et la formation de structures semblables à celles d'appressorium, pour la pénétration dans l'hôte. Le mycoparasitisme des isolats de *Trichoderma* a été démontré sur un certain nombre de champignons phytopathogènes (Harman et al., 2004 ; Vinale et al., 2006 ; Bailey et al., 2008, Hilaire et al., 2015).

Nous avons noté une vacuolisation du cytoplasme des hyphes du pathogène en présence de *Trichoderma* ce qui est en accord avec les résultats de El- Hassan et al. (2013) la vacuolisation cytoplasmique des hyphes peut précéder la pénétration de l'antagoniste par la mise en jeu d'enzyme lytique.

L'étude des mécanismes impliqués dans la relation antagoniste a révélé que *Trichoderma* agit par antibiose en libérant des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne et la germination des conidies.

La production de ces substances par les espèces de *Trichoderma* a été rapportée par Dennis et Webster (1971).

Les propriétés antagonistes de *Trichoderma spp.* Produisant des métabolites volatils et non volatils ont inhibé la croissance de divers agents pathogènes telluriques (Reddy et al., 2014).

Les substances volatiles produites par les antagonistes pourraient diffuser facilement et inhiber la croissance de l'agent pathogène *in vitro* et même dans le sol, elles diffusent facilement à travers les pores du sol et inhibent la croissance des pathogènes (Wheatley, 2002).

Nous avons constaté aussi que le filtrat de *Trichoderma sp* a inhibé la croissance mycélienne des pathogènes ce qui a été montré dans les travaux de Çığdem et al en 2003, des différentes souches de *Trichoderma harzianum* étaient efficaces contre les agents pathogènes des plantes comme le cas pour *Fusarium culmarum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis var. Tritici* et *Drechslera sorokiniana*. Cependant, certains isolats de *Trichoderma* tels que *Trichoderma harzianum* T88 and *T. atroviride* T95 ont montré une capacité d'inhibition élevé et une suppression du *Botryosphaeria berengeriana f. sp. Piricola* qui cause apple ring rot (Kexiang et al., 2002).

En outre, l'efficacité d'un agent de contrôle biologique repose, non seulement sur un mécanisme unique, mais d'une combinaison de différents modes d'actions (Alabouvette et al., 1993). Disposer d'un spectre d'action large contre les pathogènes est parmi les critères fondamentaux qui caractérisent l'antagoniste idéal (Baker et Cook, 1982)

5. La réponse des boutures de la vigne aux différents agents fongiques

L'étude de l'antagonisme *in situ*, a permis l'obtention des résultats avec les variables étudiées à savoir : le taux d'infection et quelques paramètres agronomiques.

5.1.Descriptif symptomatologique

Dans ces essais nous avons noté une variation quantitative et qualitative dans l'expression de la maladie dite BDA sur les boutures de quelques variétés de vigne selon l'inoculation indépendante ou en combinaison avec l'antagoniste (**figures : 32-41**).

(i) Inoculation indépendante (l'agent pathogène)

Les tests de pathogénicité ont été réalisés sur des boutures de vigne : Cardinal, Red Globe, Datal, Victoria, Muscat d'Italie, Alphonse lavalée, Debouki et deux porte-greffe (SO4, 1103P). Après quatre semaines d'incubation, différents types de lésions se sont développées sur les boutures inoculées par *Botryosphaeria dothidea*. Des nécroses plus ou moins importantes ont été notées sur les variétés, alors que sur le témoin non inoculé aucune nécrose n'a été noté (**Fig.29.a**).

Sur les 250 boutures infectées , nous avons noté des décoloration vers le haut et vers le bas du point d'inoculation, l'isolat testé a induit des nécroses internes et des chancre chez la variété Datale et les autres variétés (**Fig.29.b,c**)

La longueur des lésions obtenus à partir du point d'inoculation, diffère en fonction des variétés de vigne testées. La moyenne maximale de cette longueur était enregistré sur les variétés Datale et Muscat d'Italie, elle varie respectivement de $(8 \pm 0,79 \text{ cm})$ et $(7,94 \pm 0,32 \text{ cm})$ (**Fig. 30**). Tandis que, la moyenne minimale de la longueur des lésions est enregistré sur les variétés Cardinal et Victoria avec des valeurs $(3,46 \pm 0,32 \text{ cm})$ et $(4,02 \pm 0,29 \text{ cm})$ respectivement, concernant les deux port-greffe les moyennes des longueurs des nécroses sont de $(3,02 \pm 0,37 \text{ cm})$ pour la Bouture SO4 et $(5,62 \pm 0,38 \text{ cm})$ pour 1103P (**Fig. 30**).



Figure. 29 : Des nécroses internes et des chancre sur la variété Datala

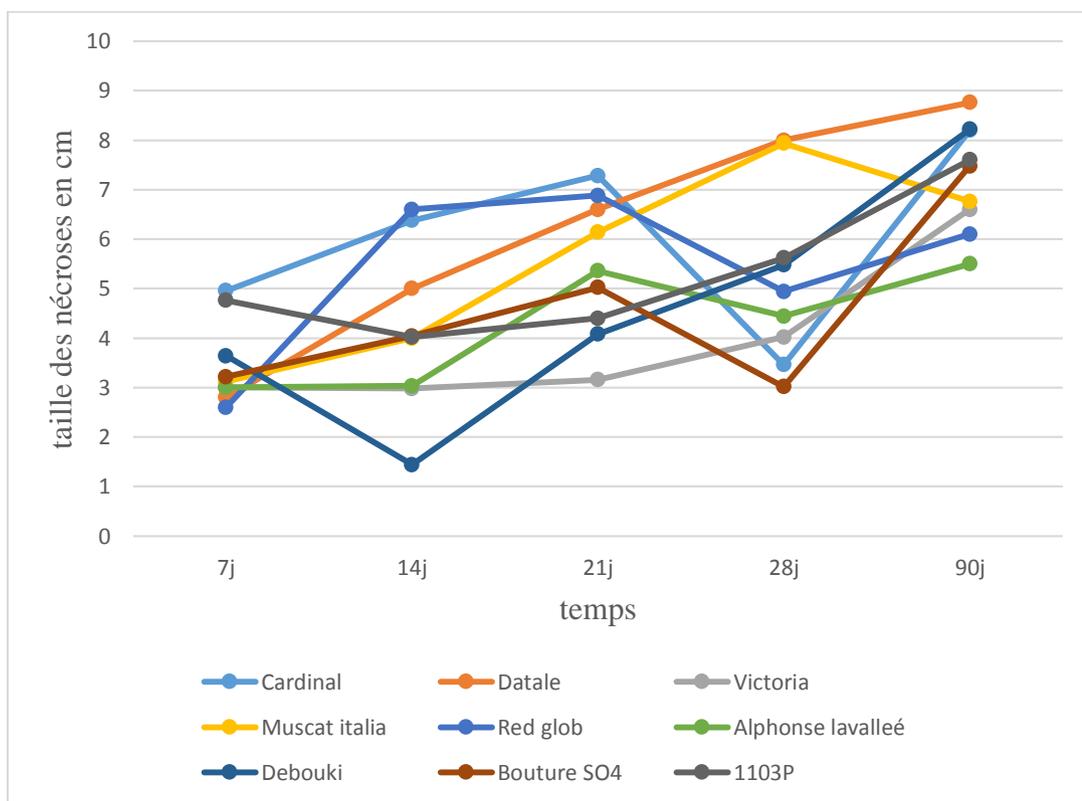


Figure. 30 : Evolution des tailles des nécroses des boutures inoculées par le pathogène

(ii) Co- inoculation (pathogène * antagoniste)

Nous avons constaté nettement une régression de la maladie au niveau des boutures infectées et traitées avec *Trichoderma sp.* D'après les résultats de la (Fig.31) la plus importante réduction de la longueur de la lésion était de (5,2cm), cette réduction est enregistrée sur les boutures de deux variétés à savoir ; Datale et Muscat d'Italie (MUSCAT ITALIA) après un mois d'incubation. Comparativement avec les boutures des deux variétés, Debouki et Victoria dont la réduction était moyenne (2,8cm). Nous avons aussi enregistré une réduction remarquable des nécroses sur le porte-greffe 1103P de (2,68cm).

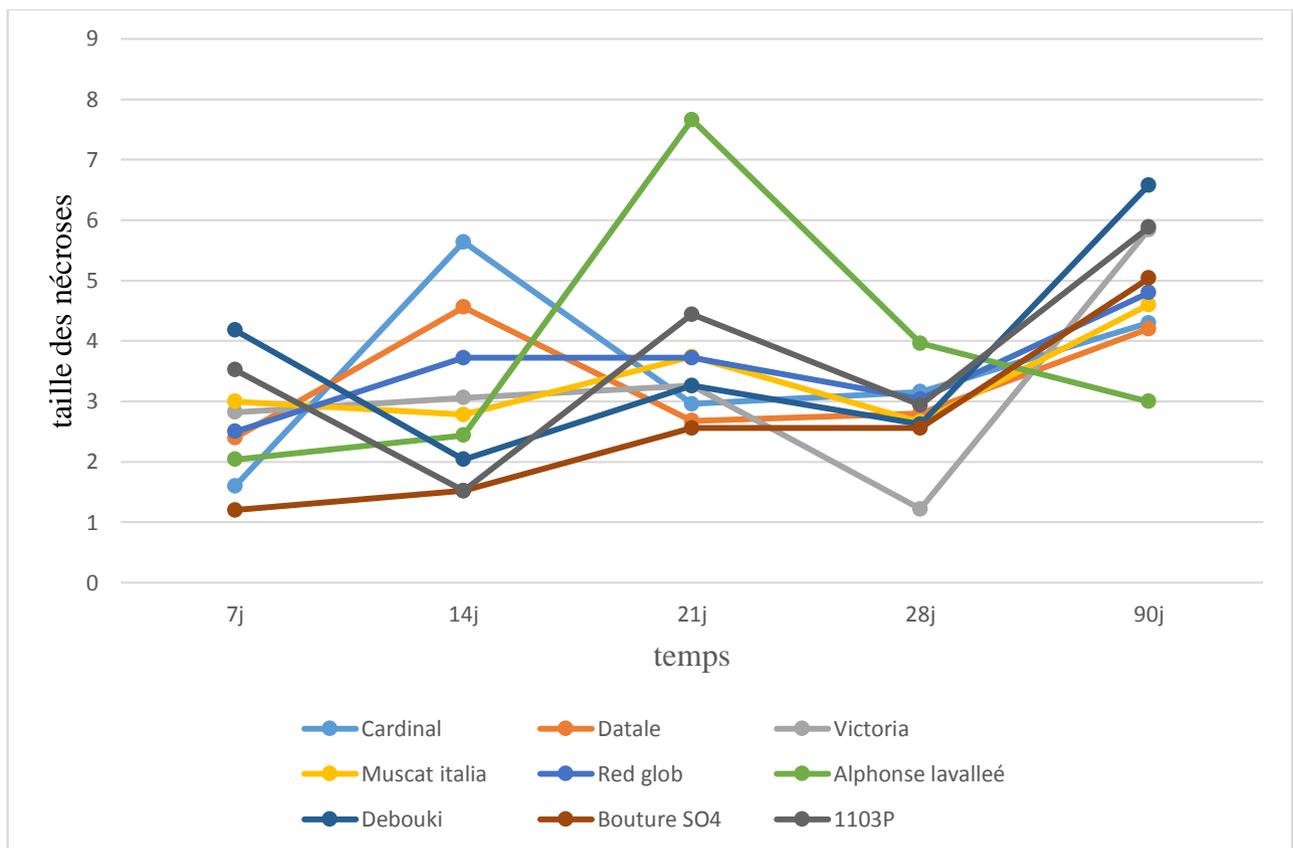


Figure.31 : Evolution des tailles des nécroses des boutures inoculées par le pathogène et traitées par *Trichoderma sp.*



Figure. 32 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Victoria).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).



Figure. 33 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Red glob).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).



Figure. 34 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Muscat italia).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).

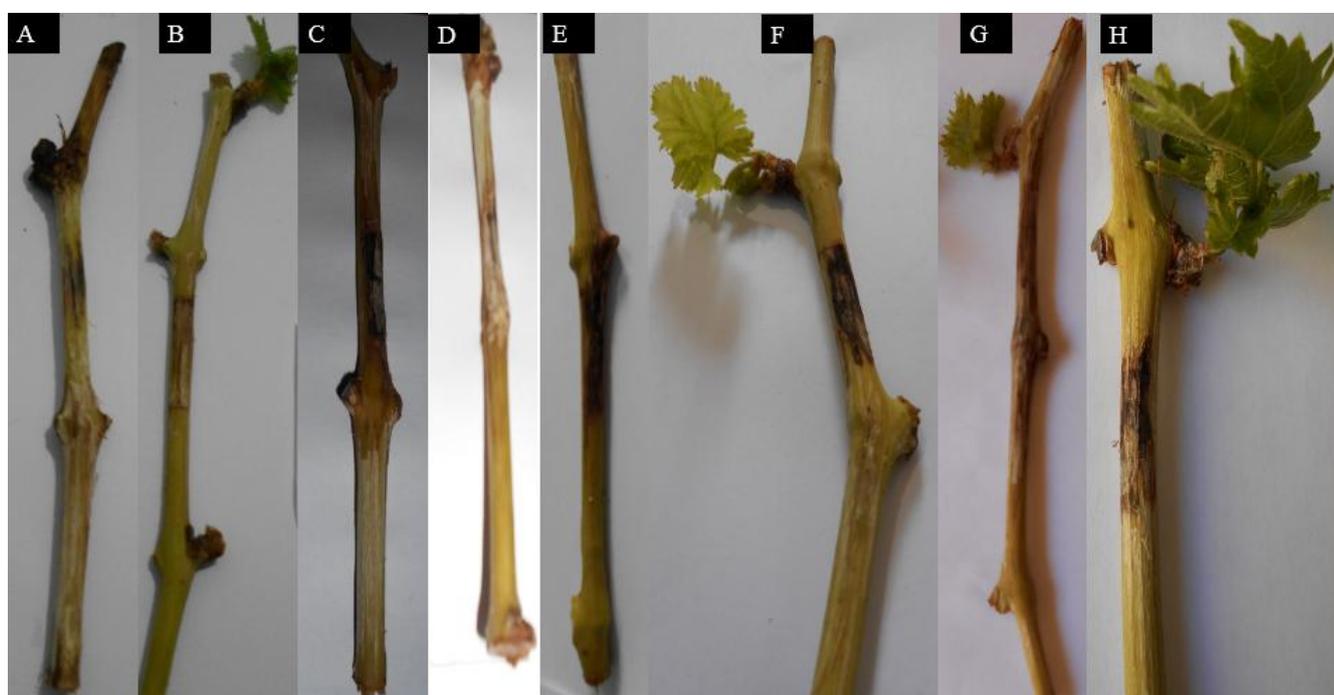


Figure. 35 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Datable).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).



Figure. 36 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Cardinal).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).

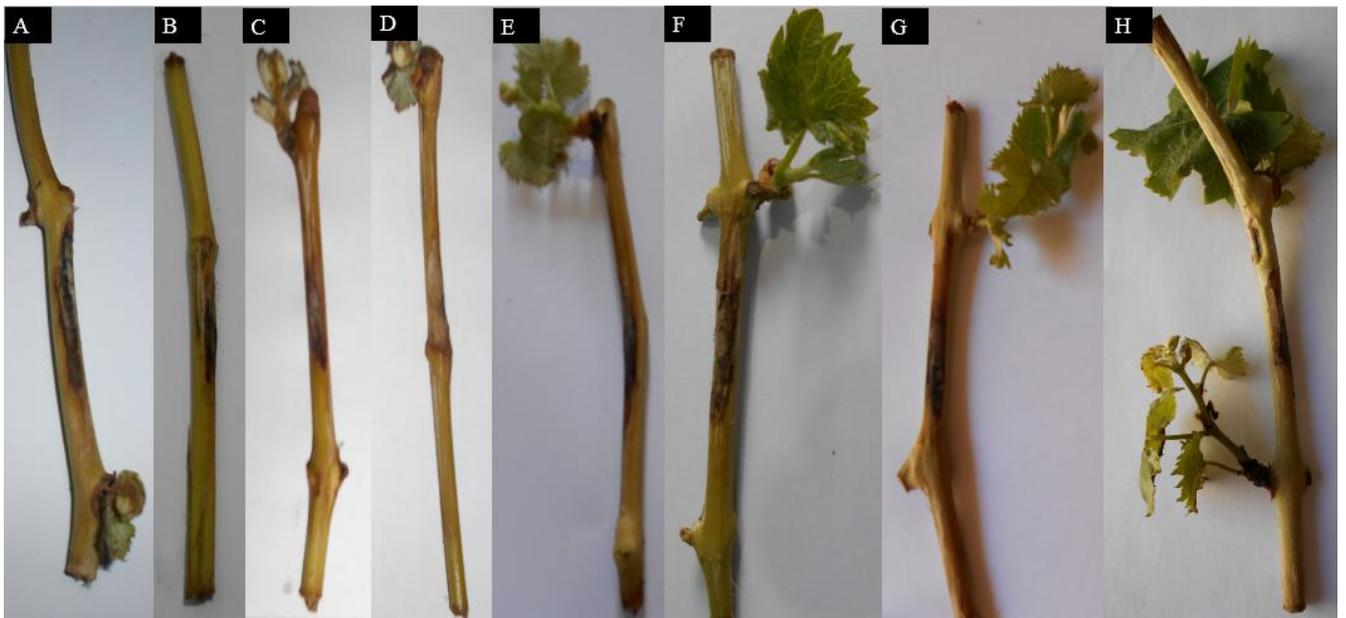


Figure. 37 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Alphonse Lavallé).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).



Figure. 38 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (porte-greffe 1103P).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).



Figure.39 : Disparition total des lésions sur port-greffe 1103P



Figure. 40 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (variété Debouki).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).



Figure. 41 : Les nécroses présentées sur les boutures de *Vitis vinifera* (bouture SO4).

(A, C, E, G) : inoculé par *Botryosphaeria dothidea* (B, D, F, H) : co-inoculation de *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria dothidea* au bout de 7jours (A, B), 14jours (C, D), 21jours (E, F) et 28jours (G, H).

Nous avons utilisé le modèle général linéaire (G.L.M), de manière à étudier d'une part la fluctuation temporelle de la taille des lésions provoquées sur les bouture de vigne, les variables quantitatives ont été scorées par rapport à deux agents fongiques (pathogène, antagoniste)

L'analyse de la variance (GLM) (**Tab. 6**) a indiqué une différence hautement significative ($P = 0.000$, $P < 5\%$). Les variétés testées étaient sensible à *B. dothidea* en comparaison avec le témoin non infecté (**Fig.42.a**), les résultats de l'analyse de la variance, ont aussi montré que la période et les agents fongiques exercent un effet hautement significatif sur la taille des lésions ($p=0,00$, $p<0,01\%$) (**Fig.42.b et c**).

Tableau. 6 : Longueur des nécroses sur des boutures de vigne après 4 semaines d'inoculation par les agents fongiques

Variétés	Isolats	longueur de la lesion (cm)	Test GLM
Cardinal	<i>B.dothidae</i>	3,46±0,320	P = 0.000, P < 1%
	<i>combainaison</i>	3,16± 0,207	
	témoin	0	
Datale	<i>B.dothidae</i>	8± 0,790	
	<i>combainaison</i>	2,8± 0,234	
	Témoin	0	
Victoria	<i>B.dothidae</i>	4,02± 0,294	
	<i>combainaison</i>	1,22± 0,414	
	témoin	0	
Muscat italia	<i>B.dothidae</i>	7,94± 0,328	
	<i>combainaison</i>	2,66± 0,409	
	Témoin	0	
Red glob	<i>B.dothidae</i>	4,94± 0,753	
	<i>combainaison</i>	3,04±0,181	
	témoin	0	
Alphonse lavalloé	<i>B.dothidae</i>	4,44± 1,878	
	<i>combainaison</i>	3,96± 0,461	
	Témoin	0	
Debouki	<i>B.dothidae</i>	5,48± 0,370	
	<i>combainaison</i>	2,62± 1,040	
	témoin	0	
Bouture SO4	<i>B.dothidae</i>	3,02± 0,370	
	<i>combainaison</i>	2,56± 0,343	
	Témoin	0	
1103P	<i>B.dothidae</i>	5,62± 0,389	
	<i>combainaison</i>	2,94± 0,270	
	témoin	0	

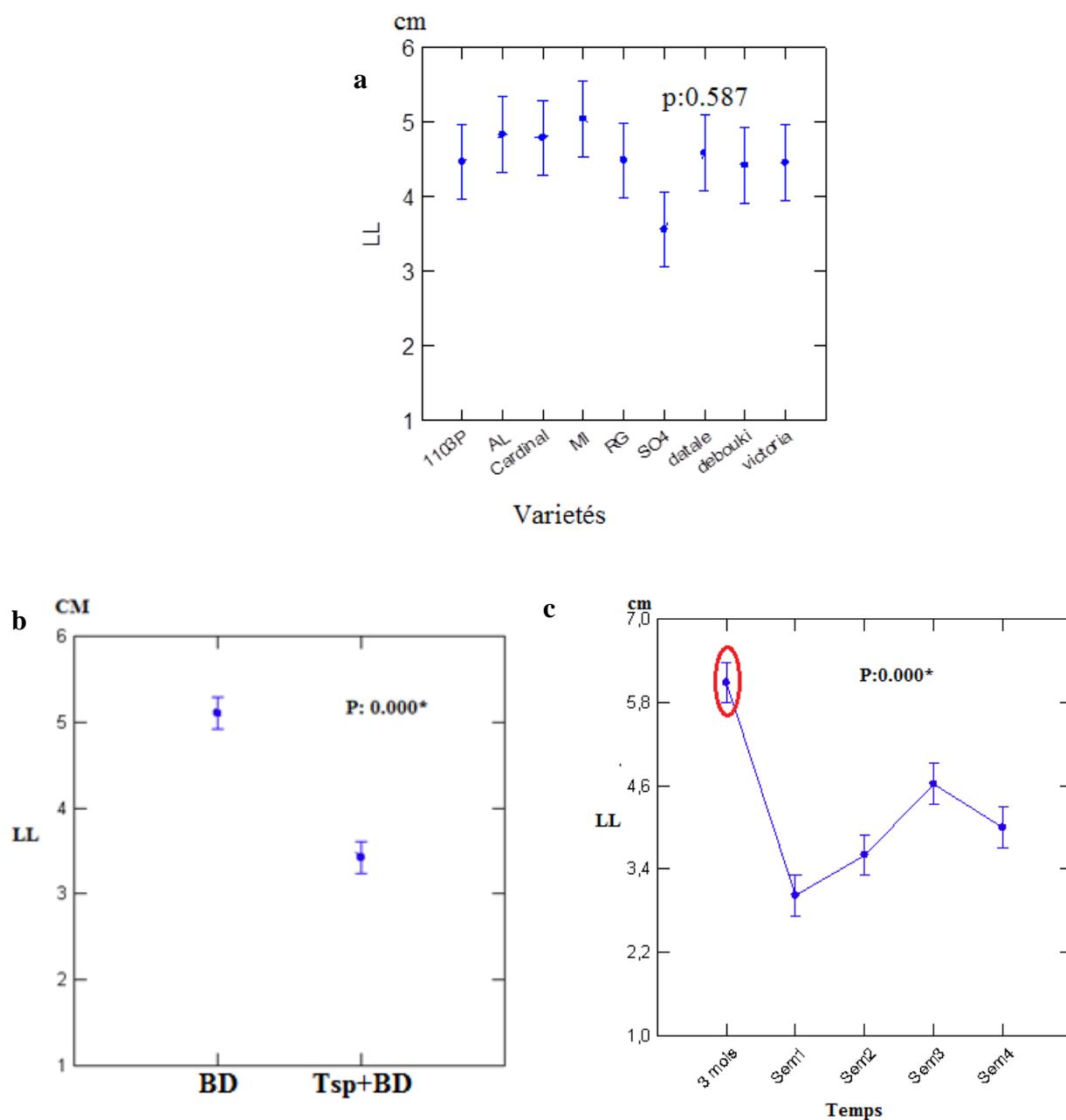


Figure. 42 : Les longueurs des lésions provoquées sur les boutures traitées, variétés (a), agents fongiques (b) et (c) temps. LL : longueur des lésions.

5.2. Etude comparée de la variation de la taille des lésions provoquées sur les boutures de vigne en fonction du temps en fonction du traitement testé et en fonction de la variété

D'après l'analyse de la variance (GLM), la longueur des lésions signale une différence très significative pour le facteur temps ($F=10.740$; $P=0.000$, $P<0.01\%$) et pour le facteur traitement ($F=50.321$; $P=0.000$, $P<0.01\%$), par contre pour le facteur variété ($F=0.819$; $P=0.587$, $P>0.01\%$).

Concernant l'effet temporel, les résultats montrent augmentation progressive des tailles des lésions durant toute les périodes d'essai (**Fig.43**). Le test de Tukey désigne l'existence de deux groupes homogènes (a et b).

L'expression de la taille des lésions provoquées sur la variété : Cardinal, Red Globe, Datale, Victoria, Muscat d'Italie, Alphonse lavalloé, Debouki et les deux porte-greffe indique une différence prononcée en fonction des agents fongiques testés, cette évolution a été notée sur les boutures inoculées surtout par l'agent pathogène *B. dothidea*. Cette dernière est confirmée par l'analyse de variance linéaire par une probabilité très significative, La comparaison par paire réalisée par le test de Tukey a classé respectivement l'agent pathogène dans le groupe a, agent antagoniste et la co-inoculation dans le groupe b. (**Fig.43**).

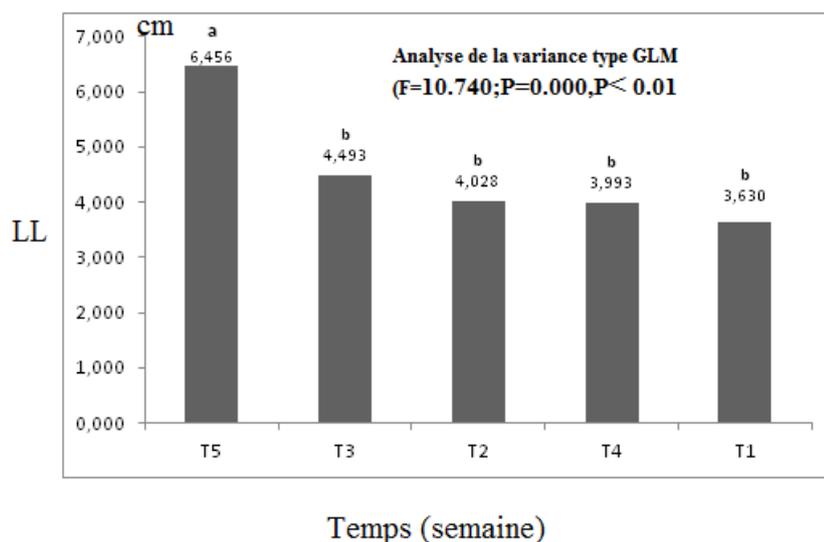


Figure. 43 : Test post Hoc pour le facteur temps sur la variation de la taille des lésions provoquées sur bouture de vigne

T1 : une semaine, T2 : deux semaines, T3 : trois semaines, T4 : 4 semaines, T5 : trois mois

A propos des traitements, on constate une nette différence d'effet de *Tricoderma* qui se traduit par une forte réduction de la taille des lésions par rapport à celui inoculé par le pathogène seule (Fig.44), ces traitements sont désignés par deux groupes homogène distinct (a) et (b).

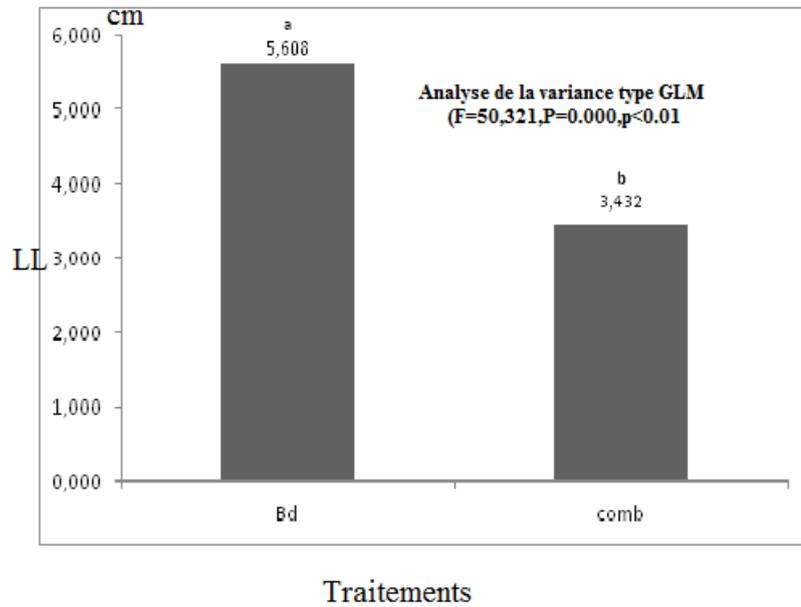


Figure. 44 : Test post Hoc pour le facteur traitement sur la variation de la taille des lésions provoquées sur bouture de vigne

Le test de Tukey désigne pour le facteur variété l'existence d'un seul groupe homogène(a), montrant aucune différence dans la réponse des boutures au stress provoqué.

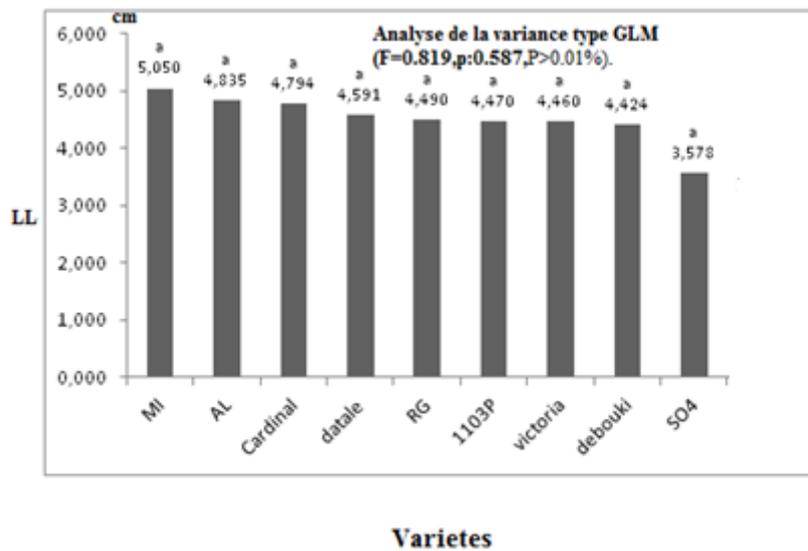


Figure. 45 : Test post Hoc pour le facteur variété sur la variation de la taille des lésions provoquées sur bouture de vigne

5.3. Le ré-isolement

Les résultats du ré-isolement sur le milieu PDA de l'agent pathogène(*BD*) à partir des boutures du témoin et des boutures traitées par *Trichoderma sp*,

D'après les résultats observés (**fig.46**), le développement du pathogène a été inhibé pour les buchettes traitées par *Trichoderma sp* pour les variétés testées.



Figure. 46 : Le ré-isolement des agents fongiques sur DEBOUKI : inoculé par *Tsp et BD*, (a) :3jours, (b) :4jours, (c) :6jours

Par contre aux ré-isolement des buchettes inoculées de pathogène seul, les résultats obtenus sont montré le développement de la *BD* seul.

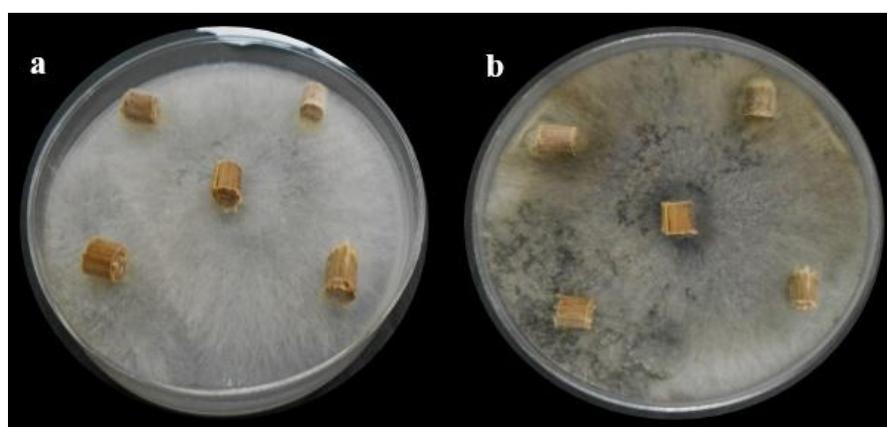


Figure. 47 : le ré-isolement des agents fongiques : inoculé par *BD*, (a) :3jours, (b) :6jours

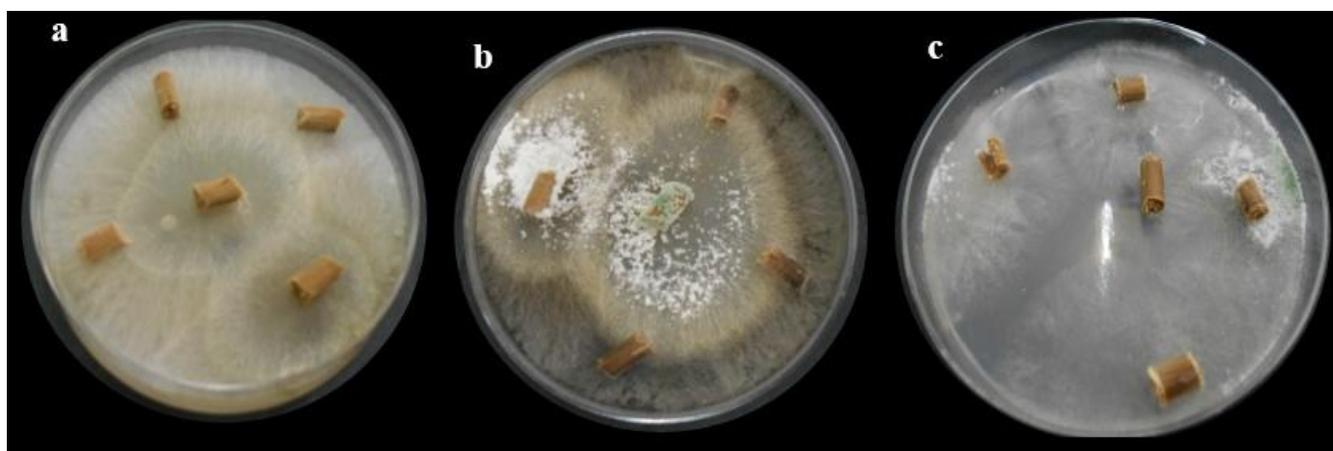


Figure. 48 : le ré-isolément des buchettes de port-greffe inoculer simultanément par le pathogène et l'antagoniste : (a,b : au milieu, 3 jours, 6 jours c ; extrémité, 3 jours) .

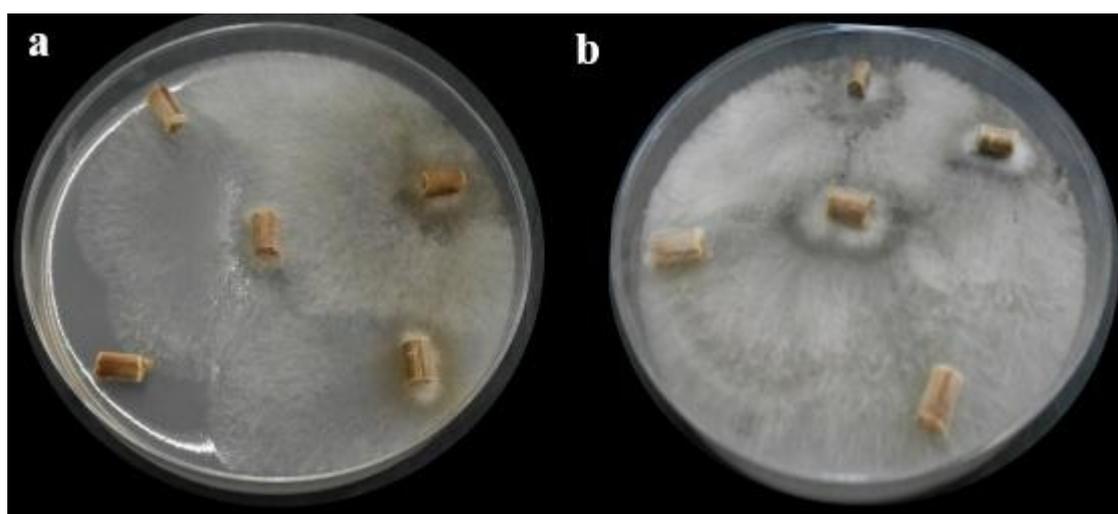


Figure. 49 : Le ré-isolément des buchettes de port-greffe inoculer par le pathogène : (a : 3 jours, b : 6 jours d'incubation).

5.4. Evaluation de la phytostimulation

5.4.1. Les paramètres agronomiques :

Après l'inoculation des boutures de vigne (*Vitis vinifera*) : par l'agent pathogène et la co-inoculation, nous avons enregistré les résultats présentés dans le **Tableau7**.

➤ Longueur de la partie aérienne (H)

(i) Agent pathogène

Les résultats du **tableau 7** montrent une longueur assez faible de la partie aérienne des boutures des variétés (Victoria, Alphonse lavallée et Muscat d'Italie) inoculées par *B. dothidea* par rapport au témoin. Et aucune longueur a été remarquer sur les boutures des porte-greffes.

(ii) Co-inoculation

Les résultats montrent une augmentation significative de la longueur da la partie aérienne des boutures traitées par la combinaison *Trichoderma* x *B.dothidea*. Cette augmentation est de 5,8 cm pour Alphonse lavallée et 5,3 cm pour cardinal para rapport au témoin non inoculé au bout de 4 semaines (**Tab.7**).

➤ La longueur de la partie racinaire (LR)

(i) Agent pathogène

Après 4 semaines d'exposition des boutures de vigne aux différents agents fongiques : agent pathogène et co inoculation, *Trichoderma* sp a montré un effet assez faible sur la stimulation de la longueur des racines de quelques variétés. La longueur des racines de Muscat d'Italie a atteint 2cm et celle de Red glob et Datale a atteint 1cm avec une absence totale sur les autres variétés et porte-greffes.

(ii) Co-inoculation

Nous avons enregistré une longueur de 9cm et 8,9cm pour Victoria et Muscat d'Italie respectivement avec les boutures traitées avec (*Trichoderma* sp et *B. dothidea*). Par contre les boutures traitées par l'agent pathogène ont montré une longueur assez réduite.

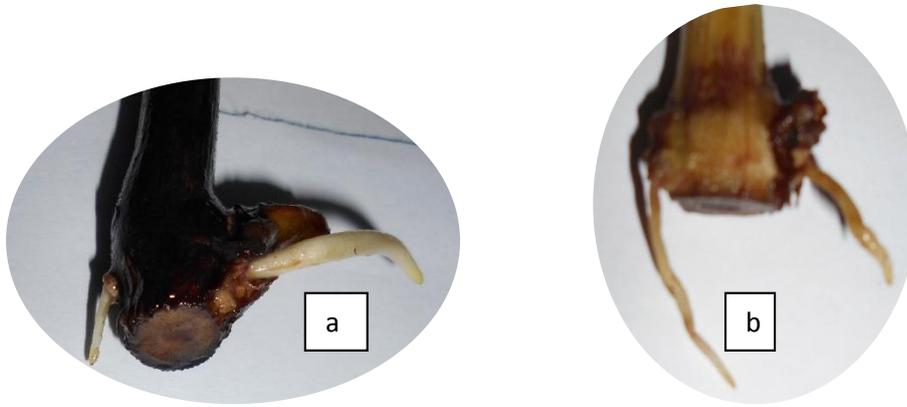


Figure. 50 : Apparition des racine sur alphonse lavaléé(a) et Red glob (b)après deux semaine d'inoculation avec l'antagoniste

Tableau 7. La longueur des tiges et racines par rapport aux traitements et aux variétés.

Hauteur des tiges (cm)							
Traitement	Cardinal	Datale	Victoria	Muscat italia	Red glob	Alphonse lavaléé	Debouki
T1	7,2	8	8,8	5,9	5,5	3,4	6
T2	5,5	9	3,5	3,4	4,5	2	4
T3	12,5	10	10,8	7	9,5	9,2	4

Longueurs des racines (cm)							
Traitement	Cardinal	Datale	Victoria	Muscat italia	Red glob	Alphonse lavaléé	Debouki
T1	3,3	2	4,5	5	1,6	5,8	4,2
T2	ab	1	ab	2	1	ab	ab
T3	6,7	5,5	9	8,9	2,5	7	7,1

T1 témoin

T2 : traiter par *B. dothidae*

T3 : Co-inoculation de *Trichoderma sp* + *B. dothidae*.

ab :absence

Par rapport à l'ensemble des traitements testés, *Trichoderma sp* a montré un effet important sur la stimulation de la longueur des tiges et des racines des variétés étudiées. à différents paramètres de croissance (longueur des tiges et des racines). Ce modèle permet d'étudier l'effet strict des différents facteurs sans faire intervenir les interactions entre facteurs.

Discussion

L'objectif de cette étude, est de tenter de détecter un éventuel pouvoir antagoniste *in situ* d'un agent fongique *Trichoderma* sp à l'égard d'un isolat phytopathogène appartenant au genre *Botryosphaeria* (*Botryosphaeria dothidea*) agent de dépérissement et d'évaluer l'effet biostimulant de cet agent bénéfique.

Le genre *Trichoderma* est un groupe agronomiquement important car il comprend des champignons « agents de biocontrôle » dont le mode d'action a fait l'objet de nombreux travaux. Des études récentes font en effet l'état d'une capacité de ce champignon filamenteux à intervenir selon divers mécanismes : mycoparasitisme, antagonisme (compétition), antibiose (production d'antibiotiques), stimulation racinaire, stimulation de la croissance par solubilisation de minéraux fertilisants, stimulation des défenses naturelles des plantes (SDN).

Les résultats de biocontrôle *in situ* concordent avec ceux obtenus dans plusieurs recherches sur des essais réalisés *in vitro*, sur serre ou en pleine champ (Comporota, 1985 ; Davet, 1986 ; Mouria et al, 1997 ; Hjeljord et Tronsmo, 1998).

Après quelques semaines d'incubation des boutures de vigne, les résultats de pathogénicité ont montré que *B. dothidea* a provoqué des lésions sur les tiges des variétés testées : Cardinal, Red Globe, Datale, Victoria, Muscat d'Italie, Alphonse lavalée, Debouki et les deux porte-greffe (SO4, 1103P).

B. dothidea s'est montré plus rapide dans le développement des lésions avec une précocité dans l'apparition des symptômes sur les plants inoculés. La taille des lésions des boutures infectées est importante chez les deux variétés inoculées avec les isolats pathogènes, Datale et Muscat d'Italie, allant de 7,94cm à 8cm.

Une différence très significative a été enregistrée entre la taille des nécroses des boutures inoculées par les antagonistes et celles inoculées par le pathogène. Une nette réduction de la taille des lésions a été enregistrée sur les plants inoculés par le pathogène et *Trichoderma*, l'antagoniste (*Trichoderma* sp) a montré en effet un fort potentiel antagoniste contre l'isolat pathogène testé. Le traitement simultané par les *Trichoderma* entraînent une réduction importante de la taille des lésions des boutures infectées par l'agent, La réduction de la maladie est plus importante sur les variétés Datale et Muscat d'Italie que les autres variétés.

Des résultats similaires ont été enregistrés par Larignon et al. (2001), sur des boutures de vigne variété Cabernet Sauvignon inoculé par un agent pathogène de la famille des Botryosphaeraea. La sécrétion des toxines par ces champignons, pourrait expliquer le phénomène de l'apparition de nécroses. En effet,

Djoukeng *et al.*, (2009), ont confirmé que les toxines des *Botryosphaeria*, sont transportées vers les parties herbacées et causent des symptômes à partir des points d'infections.

Trichoderma sp a montré son pouvoir antifongique vis-à-vis le champignon étudié. Les résultats obtenus montrent une nette réduction de la taille des lésions en présence de *Trichoderma* sp par rapport au témoin non traité après 90 jours de traitement. *Trichoderma* entre en compétition avec le pathogène qui peut affecter la plante, stimuler le système de défense de la plante. L'effet antagoniste des *Trichoderma* repose sur la production d'antibiotique et /ou d'enzymes hydrolytique ou d'autres métabolites secondaires à effet inhibiteur (Kubicek et Penttila, 1998). Les métabolites secondaires produits par *Trichoderma* sont nombreux ; les métabolites volatiles (Vizcaino *et al.*, 2005), les métabolites non volatiles diffusibles (Blumenthal, 2004) et les métabolites polypeptidiques (Landreau, 2001).

Plusieurs exemples de succès de la lutte biologique ont été attribués aux mécanismes de mycoparasitismes et ou l'antibiose, à la compétence rhizosphérique, aux enzymes lytiques telles que les chitinases et les glucanases et à l'induction des mécanismes de résistances de la plante (Chet, 1987 ; Yedidia *et al.*, 1999). Le renforcement des activités antifongiques a été montré chez les plantes et les microorganismes

De nombreuses études sont dédiées à l'écologie des *Trichoderma*. Les champignons appartenant à ces espèces, présentent en effet un grand intérêt, certaines améliorent la croissance et la santé des plantes, en contribuant à réduire l'utilisation des intrants de synthèse en agriculture. D'après Harman (2011), ces champignons ont la particularité de faciliter l'absorption des éléments nutritifs du sol par la plante. Ces agents antagonistes ont développé une étonnante capacité à interagir, à la fois parasite et en symbiose, avec différents substrats et les organismes vivants, y compris les plantes et autres microorganismes (Harman et Kubiek, 1998). Ce sont les plus résistants aux pesticides et aux toxines (Harman, 2004).

L'inoculation de la plante par l'antagoniste aide non seulement à contrôler les agents pathogènes mais à stimuler la croissance de la plante. Après quatre semaines d'inoculation des boutures de vigne par les agents fongiques (agent pathogène *et la co-inoculation*) nous avons noté une légère phytostimulation de *Trichoderma* sp par rapport au témoin et cela était notable sur les paramètres étudiés tel que la longueur des racines.

Nous avons remarqué que l'utilisation de l'antagoniste sur la stimulation de la croissance des boutures des variétés testées a un léger effet sur les longueurs des racines comparativement au témoin. Ce résultat peut être dû au paramètre temps, la vigne est une culture pérenne qui nécessite beaucoup de temps pour la croissance. Par contre cet agent a montré un effet positif sur les paramètres agronomiques des cultures saisonnières telles que la tomate (Btissam *et al.*, 2008) et les cultures annuelles telles que le sorgho (Berber *et al.*, 2009). Ce résultat a été obtenu dans les travaux de Baker (1988), On peut avancer

comme explication que certaines souches de *Trichoderma* semblent exercer une action stimulatrice sur la croissance des plantes, aussi bien *in vitro*, dans des conditions contrôlées et en l'absence de tout agent pathogène que dans des substrats de culture. L'addition de *T. harzianum*

Et *T. koningii* au substrat de culture a amélioré le poids de matière sèche des racines et des parties aériennes de tomate et de tabac (Windham et al,1986). Hibar et al, (2005) ont constaté que les plants de tomate traités par le pathogène et l'antagoniste présentaient un développement végétatif et racinaire plus important que les plants témoins.

Bien que les mécanismes de stimulation de la croissance des plantes par le *Trichoderma* ne soient pas encore bien élucidés, ceux-ci sont souvent attribués à leur aptitude à combattre les maladies des plantes. Dans ce sens, Hibar et al, (2005) ont expliqué la stimulation du développement d'une culture de melon à la suite de l'application du *T. harzianum* (Yedidia et al,1999) par une activation du système de défense de la plante, une augmentation de l'activité chitinase et peroxidase et un accroissement de l'activité enzymatique dans les feuilles induisant une résistance systémique chez ces plants. Par contre, Ousley et al, (1993) attribuent ce phénomène à l'inhibition des pathogènes mineurs, induisant ainsi une forte croissance et un meilleur approvisionnement des nutriments.

La stratégie de bio contrôle associées avec l'ISR donne espoirs, et certain microorganisme induisant l'ISR sont actuellement utilisées comme biopesticides tel que *Bacillus subtilis*.

Cette stratégie peut être utilisées avec succès pas seulement dans le bio contrôle mais aussi dans la phytostimulation .

Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail consacré essentiellement à l'étude de l'effet de deux stress biologiques, un agent pathogène et une souche antagoniste sur la stimulation de la défense naturelle et sur la croissance des tiges et des racines chez quelques variétés de vigne et deux porte greffe, il nous a paru intéressant de dégager des conclusions auxquelles nous avons aboutis.

Dans une première partie nous sommes intéressés à une étude taxonomique de l'espèce antagoniste *Trichoderma spp.* et les espèces pathogènes utilisées dans cette expérimentation. L'appartenance de l'isolat au genre *Trichoderma* est basée sur les caractéristiques morphologiques décrites dans les travaux de recherche. La détermination des espèces chez ce genre est délicate à cause de la grande similitude qui peut exister entre elles.

La caractérisation *in vitro* de *Trichoderma* a montré la capacité de cette souche de produire des métabolites secondaires volatils et non volatils des phytohormones (AIA) et des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire du pathogène (chitinase, cellulase, protéases et lipases), Toutes ces caractéristiques rendent ce champignon un promoteur de la croissance des plantes (PGPF).

Parmi les aspects étudiés, l'évaluation de l'activité antagoniste des isolats de *Trichoderma spp.* *in vitro* à l'égard de trois isolats du *Botryosphaeria*. et *in vitro* en testant une seule espèce.

Les résultats de cette étude ont montré que : l'application *in vitro* de *Trichoderma vis-à-vis* les agents pathogènes appartenant au genre *Botryosphaeria sp.* agents causal de dépérissement du bois de vigne a montré une activité antagoniste importante par confrontation directe ou indirect, et par le filtrat de culture où il a inhibé significativement la croissance mycélienne de tous les agents pathogènes testés avec un pourcentage d'inhibition variable (19% à 62% par rapport aux témoins).

Les résultats du test de pathogénicité des boutures de vigne *in situ* ont permis l'apparition des lésions au bout de quelques temps, les lésions les plus importante ont été enregistré sur la variété Datale, suivi par Muscat d'Italie, alors que des faibles lésions ont été noté sur les porte greffe.

Une réduction remarquable des nécroses causées par *Botryosphaeria dothidea* et traité par *Trichoderma spp* sur les mêmes variétés Datale et Muscat d'Italie et les deux portes greffe a été enregistré. *Trichoderma sp* a montré aussi un effet important sur la stimulation de la longueur des racines de quelques variétés. La longueur des racines de Victoria a atteint 9cm et celle de Muscat d'Italie a atteint 8,9cm.

Cette étude a permis la mise en évidence environ 25 groupes chimiques fonctionnels par la dominance des Acides, des Alcane, des Alcools et phénols, groupement aromatiques, des

Après 1 mois d'exposition des boutures de vigne aux différents agents fongiques : agent pathogène, agent antagoniste et co inoculation, *Trichoderma* sp a montré un effet important sur la stimulation de la longueur des racines de quelques variétés.

Quand les moyens de lutte chimique ne sont pas préconisés. Nous avons, donc cherché d'autres alternatives de lutte contre ces champignons, le recours à la lutte biologique. L'agent actif de lutte biologique utilisé est le *Trichoderma* sp.

Les résultats de la lutte menée dans cette étude semblent être intéressants. *Trichoderma* sp. a montré une pouvoir antifongique *vis-à-vis* des champignons étudiés

Dans ce contexte, la lutte biologique contre les agents causals du dépérissement à l'aide de champignons antagonistes semble être une alternative prometteuse à l'emploi des fongicides.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- Identifier l'espèce de l'isolat antagoniste par les approches de la biologie moléculaire.
- Etudier le mécanisme d'action d'éventuelle PGPF : induction du système de la résistance de la plante.
- Identifier les composés phénoliques dans le bois de vigne qui présentent l'activité antifongique la plus marquée

Références bibliographiques

- **Abe C.A.L., Faria C.B., de Castro F.F., de Souza S.R., Santos F.C., da Silva C.N., Tessmann D.J. and Barbosa-Tessmann I.P., 2015.** Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**: 15328–15346.
- *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94:146-170.
- **Albouy J., Astier S., Lecoq H., Maury Y.** (2001). Principes de virologie végétale : génome, pouvoir pathogène, écologie des virus, Éditions Quae, 488 p. ([ISBN](#) 2738009379).
- **Altomare C., Norvell W.A., Bjorkman T. and Harman G.E., 1999.** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 2926–2933.
- **Amalfitano C., Evidente A., Surico G., Tegli S., Bertelli E., Mugnai L., 2000.** Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca diseased grapevines, *Phytopath. Medit.* **39** :178–183.
- **Ammad F., Benchabane M., Toumi M., Belkacem N., Guesmi A., Cherif A., Lecomte P., Merah O.** (2014). Occurrence of *Botryosphaeriaceae* species associated with Grapevine dieback in Algeria. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **38**: 865-876.
- **Ammad F., Benchabane M., Toumi M.** (2015). New Ascomycetes Associated with Grapevine dieback in Algeria. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* **11** (2): 439- 450.
- **Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., and Evidente, A. 2011.** Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3(12):1569-1605.
- **Andrabi M., Vaid A., Razdan VK., 2011.** Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *J Plant Prot Res* 51: 5–59.
- **Anith.K.N, 1997,** Molecular basis of antifungal activity of a fluorescent pseudomonad, Ph.D. thesis, Indian Agriculture Research Institute, New Delhi, pp: 97.

- **Ann Won Chew., Nik Norulaini Nik Ab Rahman., Mohd Omar Ab Kadir .,C.C.Chen., 2012** Dried and Wet *Trichoderma* sp. Biomass Adsorption Capacity on Ni, Cd and Cr in Contaminated Groundwater *IPCBE* vol.30
- **Arnaud G., Arnaud M ., 1931**, Traité de pathologie végétale, tome 1, Le Chevalier, Paris, 993 p.
- **Auger J., Esterio M., Ricke G., et Pérez I. (2004)**. Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* **88** (11): 1286.
- **Auger J., Esterio M., Ricke G., Térez I., 2004**. Black Dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile, *Plant Dis.* **88** - 1286.
- **Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Crozier J., Thomas S.E., Samuels G.J., Vinyard B.T. and Holmes K.A., 2008**. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*,**46**: 24-35.
- **Baker K.F.** (1988). *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **7** (2) : 97-106.
- **Baker K.F., 1988**. *Trichoderma* spp as plant-growth stimulants - C. R. C. Crit. Rev. *Biotechnol*, **7**(2): 97-106.
- **Barbosa M., Rehm K., Menezes M., Mariano R.L., 2001**. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characteriza. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**:98-104.
- **Barr ME.,1987**. Prodrumus to class Loculoascomycetes. Published by the author,Amherst, Massachusetts, USA.
- **Ben Hassena A. (2009)**. Induction de réaction de défense chez les plantes pour lutter contre les maladies. Mémoire d'Ingénieur, Institut National Agronomique, Tunisie, 107 p.
- **Bent E., 2006**. Induced systemic resistance meditated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Tuzun, S., Bent, E. (Eds.), *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer, US, pp. 225–258.

- **Berber F.** (2008). *Sorghum bicolor*(L.) Moench dans la région du Gharb et le Loukkos : Pouvoir pathogène et recherche de moyens de lutte biologique et chimique. Thèse Doctorat, Université Ibn Tofaïl Kénitra, Maroc., 183 p.
- **Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A., Hallmann J., 2002.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, **51(2)**:215–229.
- **Berraf A. et Péros J.P., 2005.** Importance de l'eutypiose et de l'esca en Algérie et structure de la communauté fongique associée. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 39. 3, 121–128.
- **Bertsch C., Larignon P., Farine S., Clement C. et Fontaine F. (2009).** The Spread of Grapevine Trunk Disease. *Science* **324**: 721-721.
- **Bertsch, C., Ramírez-Suero,M., Magnin-Robert,M., Larignon,P., Chong,J., Abou-Mansour,E., Spagnolo,A., Clément,C., and Fontaine, F. 2013.** Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol.* 62(2):243-265.
- **Bisby G.R., 1939.** *Trichoderma viride*Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*.*Trans. Br. Mycol. Soc*, 23:149-168.
- **Bissett J., 1991a.** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Can. J. Bot*, 60:2357-2372. _
- **Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., and Samuels G.J., 2015.** Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA FUNGUS*, 6(2): 263–295. doi:10.5598/imafungus.
- **Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., and Samuels G.J., 2015.** Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA FUNGUS*, 6(2): 263–295. doi:10.5598/imafungus.
- **Bissett, J. 1984.** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sec.nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931.
- **Bissett, J. 1991a.** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* **69**: 2357-2372.
- **Bissett, J. 1991b.** A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
- **Blanchard A. et Limache F.** Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes. (SDN) Rapport bibliographique ENSAM, 2005, ENSAR et INA, P-G, 13p.

- **Brefeld O., 1891.** Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 10: Ascomyceten II. Münster Cannon PF, Hawksworth DL (1983) (701) Proposal to conserve *Nectria* over *Ephedrosphaera* and *Hydropisphaera* (Fungi). *Taxon*, 32: 476–477.
- **Bric J.M., Bostock R.M. et Silverstone S.E., 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Env. Microbiol*, 533-538.
- **Calistru C., McLean M., Berjak P., 1997.** In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, **137** :115–124.
- **Camporota P.(1985).** Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie, EDP Sciences* 5 (7) : 613-620.
- **Camps C. (2008).** Etude transcriptomique de la réponse de la vigne (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) au champignon ascomycète vasculaire *Eutypalata*, responsable de l'eutypiose. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux Segalen, 129 p.
- **Caron J., Laverdière L., Thibodeau P.O. et Bélanger R.R., 2002.** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 83 : 73-87.
- **Ceska M., 1971.** Enzyme catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem.*, **22** :186–192.
- **Chabasse D., Bouchara J.P., de Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bioforma, Edition Bioforma Paris, **25**: 26 - 45.
- **Chadefaud M. and Emberger L 1960.** Les végétaux vasculaires. In: *Traité de Botanique*, Vol. 2, Masson, Paris, France, pp. 1-1450.
- **Charrier G. (2011).** Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres : Application au noyer *Juglans regia* L. Thèse de Doctorat en Sciences de l'environnement. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. France. 220 p.
- **Chaverri P., and Samuels G.J., 2004.** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) : Species with green ascospores. *Stud. Mycol*, 48 :1-116.

- **Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T., Samuels G.J., 2015.** Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3): 558–590.
- **Chet I. (1990).** Mycoparasitism, recognition, physiology and ecology. In Baker R., Dunn P. (Eds), *New direction in Biological Control -Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. NewYork., pp.725-733.
- **Chiarappa L., 1959.,** Wood decay of the grapevine and its relationships with black measles disease, *Phytopathology* **49** :510–519.
- **Chong-Wei Li, Rui-Qing Song, Li-Bin Yang, and Xun Deng., 2015** Isolation, Purification, and Structural Identification of an Antifungal Compound from a *Trichoderma* Strain , *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(8), 1257–1264
- **Choueiri E., Jreijiri F., Chlela P., Louvet G., Lecomte P., 2006.** Occurrence of grapevine declines and first report of black dead arm associated with *Botryosphaeria obtusa* in Lebanon, *Plant Dis.* 90 -115.
- **Choueiri E., Jreijiri F., Chlela P., Louvet G., Lecomte P., 2006.** Occurrence of grapevine declines and first report of black dead arm associated with *Botryosphaeria obtusa* in Lebanon, *Plant Dis.* 90 -115.
- **Çigdem küçük., Merih kivanç., 2003.** Isolation of *Trichoderma Spp.* and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features *Turk J Biol* (27) 247-253.
- **Cole RJ, Kirksey JW., 1971.** Aflatoxin G1 metabolism by *Rhizopus* species. *Journal of agricultural and food chemistry* **19**: 222-223.
- **Coombe B.G., Dry (1998).**
- **Corda ., 1829 .***Deutschland Flora* **2**: 111.
- **Crespy A. (2009).** De la vigne à la cave – Evaluation de la quantité et de la qualité d’une récolte, Ed. Avenir Oenologie, 159 p.
- **Cristinzio, 1978 G.,** Gravi attacchi di *Botryosphaeria obtusa* su vite in provincia de Isernia, *Informatore Fitopatologico* **28** :21–23.
- **Croué C.S (2017).** La Tristeza : Lutte, traitement et remède biologique. <http://www.deco.fr/jardin-jardinage/maladie-plante-parasite/la-tristeza/>. (Consulté le 27 avril 2017).

- **Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ ,.2006.** Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol*: 235-253.
- **Crous PW., Slippers B., Wingfield MJ., Rheeder J., Marasas WFO.,2006.** Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* **55**:235–253.
- **Cummings N.J., Ambrose A., Braithwaite M., Bissett J., Roslan H.A., Abdullah J., Stewart A., Agbayani F.V., Steyaert J., Hill R.A., 2016.** Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycol Progress*, 15: 50.
- **Datta B.S., Das A.K. and Ghosh S.N., 2004.** Fungal antagonists of some plant pathogens. *Mycopathology*, **1**: 15-17.
- **Davet P., 1983.** Introduction et conservation des *Trichoderma* dans le sol. Dans : Les antagonismes microbiens. Modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. 24e Colloque de la Société Française de Phytopathologie (Bordeaux, 26- 28 mai 1983). Devannas, M.A., D.Rafaeli-Eshbol et G. Stotzky (éds). Versailles, INRA, pp. 159-168.
- **De Castro A.M., Ferreira M.C., Da Cruz J.C., Pedro K.C.N.R., Carvalho D.F., Leite S.G.F., Pereira Jr N., 2010.** High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill by product. *Enzyme Res*, 1 (1): 1–8.
- **De Marco J.L., Valadares-Inglis M.C., Felix C.R.,2003.** Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicios*a, the casual agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian J. Microbiol*, **34**: 33-38.
- **Denman S, Crous PW, Taylor JE, Kang JC, Pascoe I, Wingfield MJ ,. 2000.** An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stud Mycol*: 129-140.
- **Dennis C. and Webster J., 1971a.** Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. II.Production of volatile antibiotics. *Trans Br MycolSoc*, **57**: 41-48
- **Djoukeng J.D., Larignon P., Tabacchi R., Abou-Mansour E., 2008,** Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of

grapevine, in: 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, 1–3 Sept. Florence, Italy.

- **Djoukeng JD, Polli S, Larignon P, Abou-Mansour E., 2009.** Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *Eur J Plant Pathol* **124**: 303-308.
- **Djoukeng JD., Polli S., Larignon P. et Abou-Mansour E. (2009).** Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* **124**: 303–308.
- **Dodd, S. L., Lieckfeldt, E. and Samuels, G. J. 2003.** *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40.
- **Doi, Y., Abe, Y. and Sugiyama, J. 1987.** *Trichoderma* Sect. Saturnisporum, sect. nov. and *Trichoderma ghanense* sp. Nov. *Bulletin of the National Science Museum Series B (Tokyo)* 4: 19-26.
- **Druzhinina I., Kopchinskiy A., & Kubicek C., 2006.** The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, Vol.47 No. 2, pp. 55–64, ISSN 1618-2545.
- **Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., 2011.** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Microbiol. Rev.* 16:749–759.
- **Druzhinina, I. and Kubicek, C. P. 2005.** Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang Univ. SCI.* 6B (2):100-112.
- **Dubey S.C., 2007.** Integrating bioagent with botanical and fungicide in different modes of application for better management of web blight and mungbean (*Vigna radiata*) yield. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 77: 162-165.
- **Dubos B. (2002a).** *Maladies cryptogamiques de la vigne*. Ed 13 Féret. Bordeaux : 207 p.
- **Dubos B., (2002b).** *Les maladies cryptogamiques de la vigne champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne*, Ed Ferret (2^{ème} édition). Bordeaux : 200 p.
- **Dubos B., 1986.** 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 *Botrytis cinerea* Pers.(pourriture grise de la vigne). In : INRA Publ.,Eds. *L'emploi d'ennemis naturels dans la protection des cultures. Les colloques de l'INRA, N°34*. 10 janvier 1985. Versailles (France), pp 37-49.
- **Dubos B., Larignon P., 1987.**Esca, in: R.C. Pearson, A.C. Goheen (Eds.), Compendium on grape Diseases, APS Publ., St Paul,Min., USA, , pp. 34–35.
 - **Dubos. 1999.** Maladies cryptogamiques de la vigne, Editions Féret,Bordeaux, 176 p.
 - **Elad Y. 1996.** Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Eur J Plant Pathol **102**: 719-732.
 - **El-Hassan S.A., Gowen S.R., Pembroke B., 2013.** Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. J. Plant Prot. Res, 53 (1): 12–26.
 - **El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K., 2006.** Potential of yeasts as biocontrol agents of soil borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience 47:25-35.
 - **Enkerli J., Felix G., Boller T.1999.** Elicitor activity of fungal xylanase does not depend on enzymatic activity. Plant Physiol 121: 391-398.
 - **Escartin I. (2011).** Guide des agrumes. Fondation d'entreprise pour la protection Et la valorisation du patrimoine végétal. L'Institut Klorane. (Consulté le 20 mars 2017).
 - **Esposito E. &Silva, M. 1998.** Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*.Crit. Rev. Microbiol., 24 (2) : 89-98.
 - **Eziashi E.I., Uma N.U., Adekunle A.A., Airede C.E., 2006.** Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. Afr J Biotechnol, 5:703– 706.
 - **Federici F., 1982.** Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans*. Mycologia, **74**:738 -743.
 - **Galet P. (1995).** « Précis de pathologie viticole » , Imp .JF Impression, Montpellier, 246 P. P10
 - **Gams W, Bissett J. 1998.** Morphology and Identification of *Trichoderma* . In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London : Taylor and Francis Ltd. pp. 3–34.

- **Gams W. and Bissett J. 1998** Morphology and identification of *Trichoderma*. In:
- **Ghisalberti E.L. and Sivasithamparam, K., 1991.** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol Biochem*, 23: 1011–1020.
- **Gillmann D. (2014).** Interactions plantes-insectes dans deux écosystèmes forestiers méditerranéens contrastés : le cas des scolytes (*Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae*) en région méditerranéenne. Thèse de Doctorat en Ecologie. Université Aix-Marseille.France.157 p.
- **Gramaje D, Armengol J ., 2011.** Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant Dis* **95**: 1040-1055.
- **Gravel V., Antoun V. and Tweddell R.J., 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, 39: 1968–1977.
- **Gravel V., Antoun V. and Tweddell R.J., 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, **39**: 1968–1977.
- **Hankin L. et Anagnostakis, S.L., 1975.** The use of solid media for detection of enzyme
- **Harman G.E. (2011).** *Trichoderma* spp not just for biocontrol any more. *Pytoparasitica* **39**:103-108.
- **Harman G.E. et Kubicek C.P. (1998).** *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics1. Ed.Taylor &Francis, London. 278 p.
- **Harman G.E., 2006.** Overview of mechanis and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190–194.
- **Harman G.E., 2006.** Overview of mechanis and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, **96**:190–194.

- **Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M., 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews of Microbiology*, 2:43-58.
- **Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M., 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews of Microbiology*, 2:43-58.
- **Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M., 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews of Microbiology*, 2:43-58.
- **Harman G.E., Lorito M. et Lynch J.M. (2004).** Uses of *Trichoderma* spp to alleviate or remediate soil and water pollution *Adv. Appl Microbiol* **56**:313-330.
- **Harmann GE, Kubicek CP** (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London. P: 3–34.
- **Herlemont B. (2004-b).** «Contexte réglementaire de l'interdiction de l'arsénite de sodium », Rencontre Technique: Les maladies du bois en Midi-Pyrénées (Station Régionale ITV Midi-Pyrénées), p. 13.
- **Hermosa R., Viterbo A., Chetand I., Monte E., 2012.** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158:17–25.
- **Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. et El Mahjoub M. (2005).** Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **9** (3) :163-171.
- **Hilaire K.T., Antoine B.B., Faustin S.D., Souleymane C., Laurent K.K., Tchoa K. et Daouda K., 2015.** Biopotential of Some *Trichoderma* spp. against Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* Causal Agent of Cotton Wilt. *British Microbiology Research Journal*, 10 (5): 1-11pp.
- **Hoitink HAJ., Maden LV., Dorrance AE., 2006.** Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology* **96**:196-189

- **Howell C.R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87: 4–10.
- **Howell C.R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87: 4–10.
- **Hsieh WH., Chen CY.,1994.** Sivanesia, a new botryosphaeriaceous ascomycete genus on *Rubus* from Taiwan. *Mycological Research* **98**: 44–46.
- **Huglin A.S. and Chneider C. (1998)** Biologie et écologie de la vigne. Tech et doc, Paris.
- **Irina S. Druzhinina ,Verena Seidl-Seiboth , Alfredo Herrera-Estrella , Benjamin A. Horwitz, Charles M. Kenerley, Enrique Monte, Prasun K. Mukherjee, Susanne Zeilinger, Igor V. Grigoriev and Christian P. Kubicek. 2011.** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*. Volume 9.
- **J. Grosmann .2008.** Observatoire national des maladies du bois :bilan de 4 années d'observations, Euroviti, Angers, pp. 8–17. B.
- **Jeleň H., Blaszczyk L., Chelkowski J., Rogowicz K., Strakowska J., 2013.** Formation of 6-n-pentyl- 2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol. Prog*, 13: 589–600. 10.1007/s11557-013-0942-2
- **Jiménez-Teja, D., Hernández-Galán, R., and Collado, I. G. 2006.** Metabolites from *Eutypa* species that are pathogens on grapes. *Nat. Prod. Rep.* **23**:108–16
- **Jousse C. (2004).** La recherche de molécules ambi mobiles pour lutter contre les maladies du bois », *Rencontre Technique : Les maladies du bois en Midi-Pyrénées (Station Régionale ITV Midi-Pyrénées)*, pp. 37
- **Kadi Z. (2012).** Sélection de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) pour la tolérance aux stress abiotiques. Thèse de Doctorat en Biologie végétale. Université Ferhat Abbas. Sétif. 126 p.
- **Kamala T., Indira Devi S., 2011.** Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythiumaphanidermatum* on common beans. *3. Biotech*, **1**:217–225.

- **Karimi M.R., Mahmoodi B., 2001.** Kazemiyan M., First report of esca of grapevine in Iran, *Phytopath. Medit.* **40** :S481.
- **Kausar H., Sariah M., Saud HM ?, Alam MZ., Ismail MR., 2010.** Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. evaluation to accelerate the action of extracellular cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **64 (7)**:594-600.
- **Kexiang G., Xiaoguang., Yonghong Z., Tianbo and W. Shuliang 2002** , Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to Control *Botryosphaeria berengeriana* f. *sp. piricola*, the Cause of Apple Ring Rot., *J. Phytopathology* **150**, 271–276.
- **Klein D. et Eveleigh D.E., 1998.** Ecology of *Trichoderma*. Kubicek C.P., Harman G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics, Taylor and Francis Ltd, London, pp. 57–74.
- **Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Böner, T., Meyer, W. and Kubicek, C. P. 1997.** Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA transcribed spacer sequences. *Mycologia* **89**:442-460.
- **Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. and Kubicek, C.P. 2002.** Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* **106(7)**: 757-767.
- **Kuntzmann P, Villaume S, Larignon P, Bertsch C., 2010.** Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis* **49**: 71-76.
- **Kuntzmann P., Vuillaume S., Bertsch C., 2008,** Dispersal of *Botryosphaeria* spp. Conidia in vineyards, in: 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, 1–3 Sept. Florence Italy.
- **Lambert C. (2011).** Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Thèse de Doctorat en Œnologie. Université Bordeaux 2 .France.202 p.
- **Larignon P. (2008).** Rôle du matériel végétal dans la propagation des champignons associés aux maladies du bois IFV. p 53.

- **Larignon P. (2009a)**. Le point sur les maladies du bois : symptomatologie, cycles biologiques, influence des facteurs environnementaux, bilan des recherches et perspectives), *Matinées Techniques du BIVB : Mieux comprendre les maladies du bois*, pp. 1-30.
- **Larignon P. et Dubos B. (2001)**. Le Black Dead Arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma* **538** : 26-29.
- **Larignon P., 1991**, Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome de l'esca de la vigne, thèse 3ème cycle, université de Bordeaux II, France, 238 p.
- **Larignon P., 2004**.Réflexions sur l'esca, *Phytoma* 576 28–31.
- **Larignon P., Berud F., Girardon K., Dubos B., 2006**.Maladies du bois de la vigne. Quelques éléments sur la présence des champignons associés, leur localisation dans le bois et les moments de contaminations, *Phytoma* **592** :14–17.
- **Larignon P., Coustou I., Darné G., Dubos B., 2003**, Les différences précoces de la composition anthocyanique foliaire de Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) atteint par l'Esca ou par le Black Dead Arm, in : 7ème symposium international d'oenologie, Editions Tec., pp. 33–35.
- **Larignon P., Dubos B., 2001**Le Black Dead Arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca, *Phytoma* 538 26–29.
- **Larignon P., Dubos B., 1997**.Fungi associated with esca disease in grapevine, *Eur. J. Plant Pathol.* 103 : 147–157.
- **Larignon P., Dubos B., 2001**. Il punto sul ciclo biologico dei funghi coinvolti nella sindrome dell'esca, *Informatore Fitopatologico* **5** : 27–31.
- **Larignon P., Dubos B., 2001**.The villainy of Black Dead Arm,*Wines and Vines* 86–89.
- **Larignon P., Fontaine F., Farine S., Clement C. et Bertsch C. (2009b)**. Esca and black dead arm: two major actors of grapevine trunk diseases. *Comptes rendus biologies* **332**: 765-783.
- **Larignon P., Fulchic R., Ceré L., Dubos B., 2001**.Observation of Black Dead Arm in French vineyards, *Phytopath. Medit.* **40** : S336–S342.

- **Larignon P., Giansetto K., Salancon E., Girardon K., Berud F., Jacquet O., Coarer M., 2008.** Champignons associés aux maladies du bois : une enquête en pépinières, Rhône en VO 3 : 26–31.
- **Le Courrier d'Algérie.** (2014). quotidien national d'information. Blida : une région agricole et touristique d'excellence à l'histoire ancestrale. Maison de presse Kouba. (consulté le 03 mai 2017).
- **Lecomte P., Darrietort G., Defives A., Louvet G., Liminana J.M., Blancard D., 2006.** Observations of Black Dead Arm symptoms in Bordeaux vineyards: Evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal necroses, questions, hypotheses, Integrated Protection in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin **29 (11)** :93–94.
- **Lecomte. P., Darrietort G., Dfives A., Louvet G., Liminana J.M. and Blancard D. (2006).** Observations of Black Dead Arm symptoms in Bordeaux vineyards: evolution of foliar symptoms, btuse ms on of longitudinal necroses, questions, hypotheses. IOBC WPRS Bulletin, 29(11), p.93.
- **Lehoczky J., 1974.** Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection, Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae **9** : 319–327.
- **Lehoczky J.,1974.** Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection, Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae **9** : 319–327.
- **Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie., Edition De Boeck Université rue des minimes 39, B-1000. Bruxelles, 427 P.
- **Leuchtman A., Samuels G.J., and Petrini O., 1996.** Isoenzyme subgroups in *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. Mycologia, 88: 384–394.
- **Levadoux L .,1956.** Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera L.*, Vol. 1.
- **Lieckfeldt E., Kullnig C M., Kubiceck CP., Samuels GJ. and Borner T.,2001.** *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. Mycological Research **33**: 313-322.
- **Lima G., De-Curtis F., Castoria R., De-Cicco V., 1998.** Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorulaglutinis* against postharvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology, **8**: 257-267.

- **Lynch J.M., Wilson K.L., Ousleyet M.A. et Whipps J.M. 1991.** Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* **12** :56-61.
- **MADR (2016).** Ministère de l'Agriculture et Développement Rural.
- **Marès, H., 1865,** Livre de la Ferme. tome 2, 4 ed., 263 p.
- **Martos S., Andolfi A., Luque J., Mugnai L., Surico G., Evidente A., 2008.** Production of phytotoxic métabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*, *Eur. J. Plant. Pathol.* **121** : 451–461.
- **Moller W.J., Kasimatis A.N., 1974.** J.J. Kissler, A dying arm disease
- **Moral J, Luque F, Trapero A., 2008** : First report of *Diplodia seriata*, the anamorph of *Botryosphaeria obtusa*, causing fruit rot of olive in Spain. *Plant Dis* **92**: 311-311.
- **Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., and Michailides, T.J., 2010.** Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* **100**:1340-1351
- **Mouria B., Ouazzani-Touhami A. et Douira A. (2007).** Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection* **883** : 103–110.
- **Mu'ayad Al-Obaidy O. Al-Rijabo .M.A., 2010.** Antagonistic Activity and Production of Antifungal Compound(s) from Selected *Trichoderma* spp. Department of Biology / College of Scienc. Mosul University/Iraq. *J. Edu. & Sci.*, **23(3)**.10p.
- **Mukhlis Saud H.M., Sariah M., Ismail M.R., Kausar H. and Habib S.H., 2013.** Potential lignocellulolytic *Trichoderma* for bioconversion of oil palm empty fruit bunches. *Australian Journal of Crop Science*, **7(3)**:425-431.
- **Mukhlis Saud H.M., Sariah M., Ismail M.R., Kausar H. and Habib S.H., 2013.** Potential lignocellulolytic *Trichoderma* for bioconversion of oil palm empty fruit bunches. *Australian Journal of Crop Science*, **7(3)**:425-431.
- **Mulaw T.B., Druzhinina I.S., Kubicek C.P. et Atanasova L., 2013.** Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. *Diversity*, **5**: 750-766.
- of grape in California, *Plant Dis. Rep.* **58** :869–871.

- **Okuda T., Fujiwara A., and Fujiwara M., 1982.** Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitril antibiotics. *Agric. Biol. Chem.*, 46:1811–1822.
- **Olmo H.P. (1978)** Development of cultivated varieties for producing wine in California. *Ann Technol Agric* 27:15-26
- **Osbeck L. (2010).** Parent Washington Navel orange (CRC 1241A). *Citrus* variety collection. University of California riverside.
- **Ousley M.A., Lynch J.M. et Whipps J.M.(1993).** Effect of *Trichoderma* on plant growth; a balance between inhibition and growth promotion. *Microb. Ecol.* **26**: 277-285.
- **P. Viala, 1922.**L'apoplexie, *Bull. Soc. Pat. Veget de France IX (V)*.
- **Pascoe, E. 2000.**Cottral, Developments in grapevine trunk diseases research in Australia, *Phytopath. Medit.* 39 68–75.
- **Pascoe, E. Cottral, 2000.,** Developments in grapevine trunk diseases research in Australia, *Phytopath. Medit.* **39** :68–75.
- **Pascoe, J. Edwards, 2002.** Esca or not? *The Australian Grapegrower and Winemaker* 439 14.
- **Patten C. L., Glick B. R., 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**: 207-220.
- **Pennycook SR, Samuels GJ ., 1985.** *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New-Zealand. *Mycotaxon* **24**: 445-458.
- **Péros J.P., and Berger G., 1994.** A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa dieback*. *Agronomie*, **14**: 515-523.
- **Persoon C.H., 1794.** *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag. Bot, 1 :81-128.
- **Phillips AJL ., 2002.** *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol Mediterr* **41**: 3-18.

- **Phillips AJL, Fonseca F, Pova V, Castilho R, Nolasco G .,2002.** A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp nov. *Sydowia* **54**: 59-77
- **Phillips AJL., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M.J., Groenewald J.Z. and Crous PW. (2013).** The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology* **76**:51-167.
- **Phillips AJL., Alves A., Pennycook SR., Johnston PR., Ramaley A., 2008.**Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* **21**: 29–55.
- production by fungi. *Mycologia*, **67**: 597–607.
- **Reddy, B.N., K.V. Saritha and A. Hindumathi, 2014.** In vitro screening for antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. *Res. J. Biol.*, **2**: 29-36.
- **Rehner, S. A. and Samuels, G. J. 1994.** Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **98**: 625-634.
- **Reino J.L., Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I.G., 2008.** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*, **7**:89–123.
- **Reino J.L., Guerrero R.F., Hernandez-Galan R., Collado I.G., 2008.** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*, **7**:89–123.
- **Ren H, Lu LM, Soejima A, Luke Q, Zhang DX, Chen ZD, Wen J .,2011** Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on the noncoding plastid trnC-petN, trnHpsbA, and trnL-F sequences. *Taxon* **60**: 629-637.
- **Rifai M.A., 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*-Mycol. Pap, **116**: 1-56.
- **Roquebert M.F. 1996.** Interaction antagoniste des *Trichoderma* sp dans les systèmes telluriques : systématique, biologie et écologie des organismes. *Compte rendu des 4èmes rencontres en toxicologie*. Paris.
- **Samuels G.J., 2006.** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, **96**:195 -206.

- **Samuels G.J., Petrini O., and Manguin S., 1994.** Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86:421- 435.
- **Samuels, G. J. 1996.** *Trichoderma* : a Review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100 (8): 923-935.
- **Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlenry, L. A. and Petrin, O. 2002.**
- **Samuels, G. J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. and Kubicek, C. P. 1998.** The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Study in Mycology* 41: 1-52.
- **Sasaki M, Kaneko Y, Oshita K, Takamatsu H, Asao Y, Yokotsuka T., 1970.** Studies on the compounds produced by moulds. VII. Isolation of isocoumarin compounds. *Agricultural and Biological Chemistry* **34**: 1296-1300.
- **Sentenac G. (2004).** Evaluation de l'efficacité de fongicides et d'agents biologiques utilisés dans la lutte contre les maladies du bois Esca et BDA. Premiers résultats d'expérimentations menées sur le terrain », *Rencontre Technique: Les maladies du bois en Midi-Pyrénées (Station Régionale ITV Midi-Pyrénées)*, pp. 28-33.
- **Shafiquzzaman Siddiquee., 2012.** Bo Eng Cheong¹, Khanam Taslima, Hossain Kausar, and Md Mainul Hasan. Separation and Identification of Volatile Compounds from Liquid Cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using Three Different Capillary Columns, *Journal of Chromatographic Science* ,**50**:358–367
- **Shigo A.L., Marx H.G., 1977,** Compartmentalization of Decay in Trees, U.S. Dep. Agric., For. Serv., AIB, 73 p.
- **Shoemaker RA ., 1964.** Conidial state of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* **42**: 1297-1301.
- **Shoresh M., Yedidia I. & Chet I., 2005.** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95: 76–84.
- **Sivan A, Chet I., 1989.** Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J General Microbiol*, 135:675–682.

- **Sivan A, Chet I, 1989.** Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J General Microbiol*, **135**: 675–682.
- **Slippers B, Fourie G, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2004.** Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp nov from *B-lutea*. *Mycologia* **96**:1030-1041.
- **Slippers B., Wingfield M.J., 2007.** Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact, *Fungal Biology Reviews* **21** :90–106.
- **Slippers B., Smit W.A, Crous P.W., Coutinho T.A., Wingfield B.D., Wingfield M. J., 2007.** Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world, *Plant Pathol.* **56** :128–139.
- **Smith H, Wingfield MJ, Petrini O, 1996.** Botryosphaeria dothidea endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management* **89**: 189-195
- **Suty L., 2010.** La lutte biologique : Vers de nouveaux équilibres écologiques. Eds Quae, 323 pages.
- **Tabacchi R., Fkeyrat A., C. Poliart, G.M. Dubin, 2000,** Phytotoxins from fungi of esca of grapevine, *Phytopath. Med.* **39** :156–161.
- **Thormann M.N., Currah R.S., Bayley S.E., 2002.** The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Can J Microbiol*, **48(3)**: 204-211
- **Thormann M.N., Currah R.S., Bayley S.E., 2002.** The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Can J Microbiol*, **48(3)**: 204-211
- *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown
- **Troccoli, L., Calamassi, R., Mori, B., Surico, G., and Mugnai, L. 2001.** Phaeomoniella chlamydospora-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathol. Mediterr.* **40**:S400-S406.

- **Trocoli L., Calamassi R., Mori B., Mugnai L., Surico G., 2001** : *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: Histochemical reactions to fungal infection, *Phytopath. Medit.* **40** : S400–S406.
- **Trocoli L., Calamassi R., Mori B., Mugnai L., Surico G., 2001.***Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: Histochemical reactions to fungal infection, *Phytopath. Medit.* **40** : S400–S406.
- **Tronsmo A. and Hjeljord L.G., 1998.** Biological control with *Trichoderma* species. In G.S. Boland and L.D. Kuykendall (Eds.), *Plant-microbe interactions and biological control*, p. 111- 124.
- **Turner, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Meyer, W., Kubiceck, C. P. and Böner, T. 1997.** Revision of *Trichoderma* section *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* **89**: 442-460.
- **Tuset J.T., Piquer J., Garcia J., Hinarejos C., 1980,** Conidial state activity of *Botryosphaeria obtusa* on grapevines in the southeast of Spain, in: *Proceedings of the Fifth Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, 21–27 Sept. Patras, Grèce, pp. 60–61.
- **Úrbez-Torres JR, Bruez E, Hurtado J, Gubler WD ., 2010.** Effect of Temperature on Conidial Germination of Botryosphaeriaceae Species Infecting Grapevines. *Plant Dis* **94**: 1476-1484
- **Van niekerk J.M., Fourie P. H. Halleen F. and Crous P. W. (2006).** Botryosphaeria spp. AsGrapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia mediterranea* **45**: s43-s54. P20
- **Van Niekerk JMFPHH, F.; Crous P.W. 2006.** *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol Mediterr* **45**: S43-S54
- **Vassilev N., Vassileva M., Nikolaeva I., 2006.** Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biot*, **71**: 137-144.
- **Venkatasubbaiah P., Sutton T., Chilton W.S., 1991.**Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot, *Phytopathology* **81** : 243–247.

- **Vinale F. et al., 2007.** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, pp. 1-10.
- **Vinale F., Marra R., Scale F., Ghisalberti E.L., Lorito M. et Sivasithamparam K., 2006.** Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active different phytopathogens. Letter in *Applied Microbial*, 43:143-148.
- **Vinale F., Marra R., Scale F., Ghisalberti E.L., Lorito M. et Sivasithamparam K., 2006.** Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active different phytopathogens. Letter in *Applied Microbial*, **43**:143-148.
- **VINING, L.C., 1990.** Fonctions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44 : 395-427.
- **Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L., Chet I., 2010.** Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett*, 305:42–48.
- **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.
- **Wheatley R.E., 2002.** The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton Leeuw J Microb*, **81**:357–364.
- **Whipps J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- **Windham M.T., Elad Y., Baker R. (1986).** A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **76** (5): 518-521.
- **Xia X., Lie T.K., Qian X., Zheng Z., Huang Y., Shen Y., 2011.** Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots, 61 (3):619-25.
- **Yedidia I., Benhamou N. et Chet I. (1999).** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumissativus* L.) by the bio control agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol* **65** (3): 1061-1070.

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

- **Liens internet consultés :**
- <https://fr.actualitix.com/pays/dza/algerie-orange-production.php>. (consulté le 20 mars 2017).
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Araign%C3%A9e_rouge . (consulté le 11 juin 2017).
- <https://fr.wikipedia.org/wiki/Agrume>. (Consulté le 20 avril 2017).
- <https://fr.wikipedia.org/wiki/Boufarik>. (consulté le 16 mars 2017).
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Champignon_25_mars_2017. (consulté le 30 avril 2017).
- [http://fr.wikipedia.org/wiki/Orange_\(fruit\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Orange_(fruit)). (Consulté le 17 mai 2017).
- <https://www.agriculture-nouvelle.fr/stress-des-plantes-solutions-2/>. (Consulté le 03 mai 2017).
- <http://www.a2d.fr/page-eliciteurs-simulateur-defense.html> 2010. (Consulté le 16 mars).
- <http://www.pepinieremabrouka.com/fr/oranges/139-thompson-avel.html>. 2013. (consulté le 23 mars 2017).
- http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n05_518.65 (3), 1061-1070.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture utilisés

- **Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Rapilly, 1968)**

Pomme de terre 200 g

Glucose 20 g

Agar 20 g

Eau distillée 1 000 ml

Le milieu est par la suite autoclavé pendant 20 min à 120° C.

- **Milieu PDB (*Potato Dextrose Broth*) (Rapilly, 1968)**

Pomme de terre 200 g

Glucose 20 g

Eau distillée 1 000 ml

Le milieu est par la suite autoclavé pendant 20 min à 120° C.

- **Milieu utilisé pour la production de chitinase (Kamala et Indira Devi, 2011)**

Glucose 5 g

Na₂HPO₄ 3g

NH₄Cl 1g

NaCl 0,5 g

CaCl₂ 0,1

MgSO₄ 0,12g

Chitine colloïdale 1% (p:v)

Agar 20g

Eau distillée 1L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes. pH a été ajusté à 4,7.

- **Milieu minimal utilisé pour la production de cellulase (Kausar *et al.*, 2010 ; Kamala et Indira Devi, 2011)**

-Activité endoglucanase

Carboxy-méthyl-cellulose(CMC) 20 g

Agar 15 g

Eau distillée 1L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production d'amylase (Abe *et al.*, 2015)**

Extrait de levure 3 g

Peptone 5 g

Amidon soluble 2 g

Agar 15 g
Eau distillée 1L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de ligninase** (Thomann *et al.*, 2002)

Acide tannique 5 g
Extrait de Malt 15 g

Agar 20 g
Eau distillée 1L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de lipase** (Abe *et al.*, 2015)

Tween 20 10 mL

Peptone 10 g

NaCl 5 g

CaCl₂·2H₂O, 1 g

Agar 17 g

Eau distillée 1L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de protéase** (Berg *et al.*, 2002)

Lait allégé (non gras) 300 mL

Agar 20 g

Eau distillée 1L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes.

- **Milieu de PDB enrichi avec du tryptophane** (Bric *et al.*, 1991)

L-tryptophane 5 g

Pomme de terre 200 g

Glucose 20 g

Agar 20 g

Eau distillée 1 L

Ce milieu a été autoclavé à 120° C pendant 20 minutes.

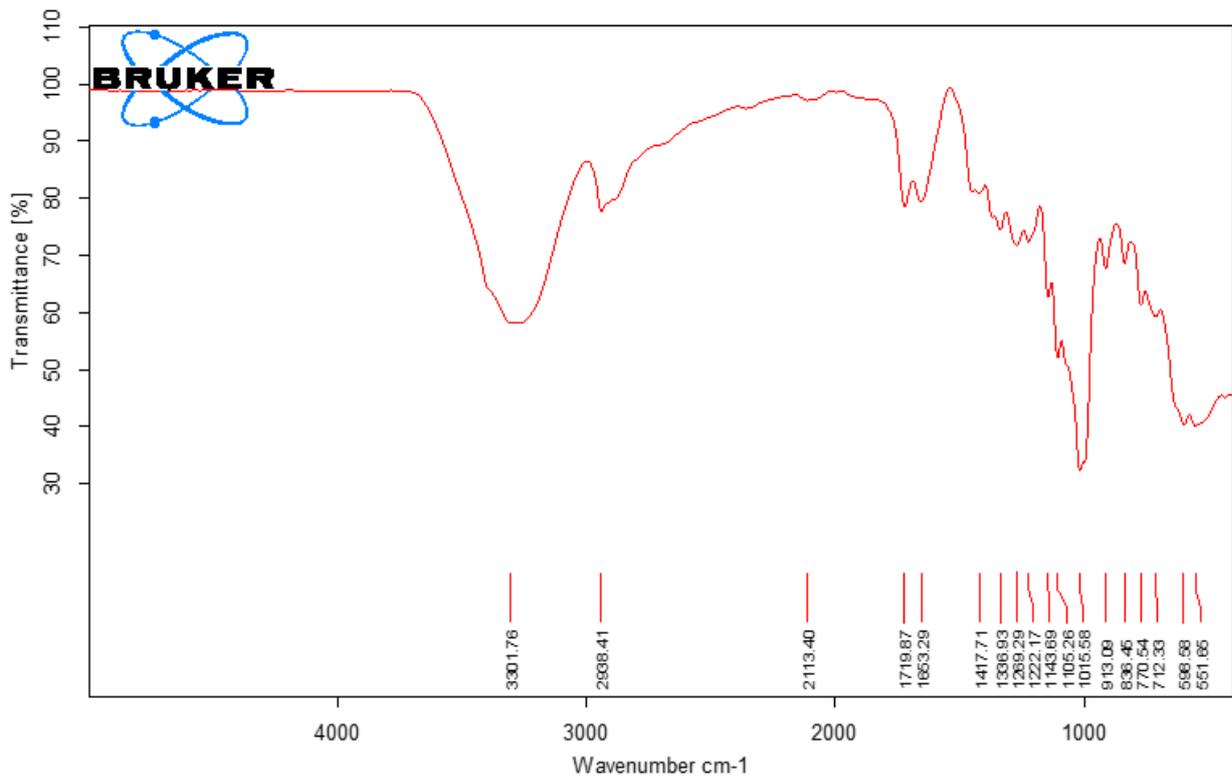
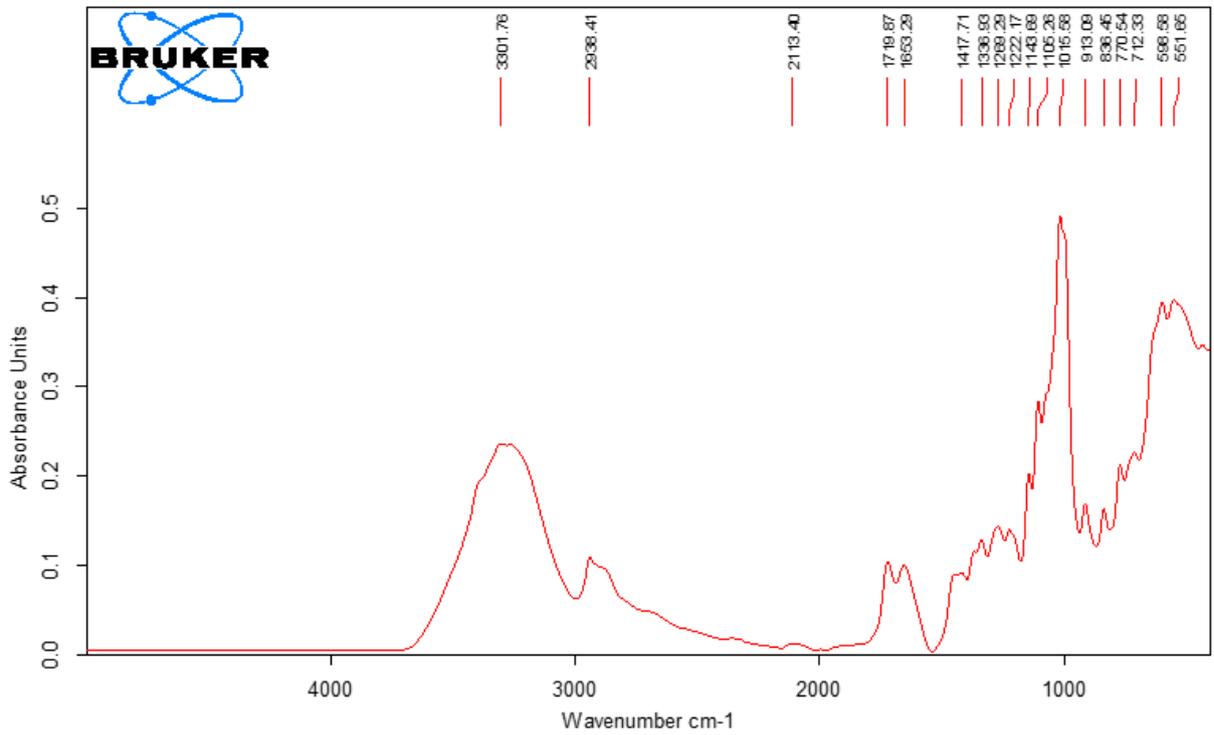
Solution de Salkowski : est composée de 2% de FeCl₃ (0,5 M) dans une solution de 35% d'acide perchlorique.

Annexe 2

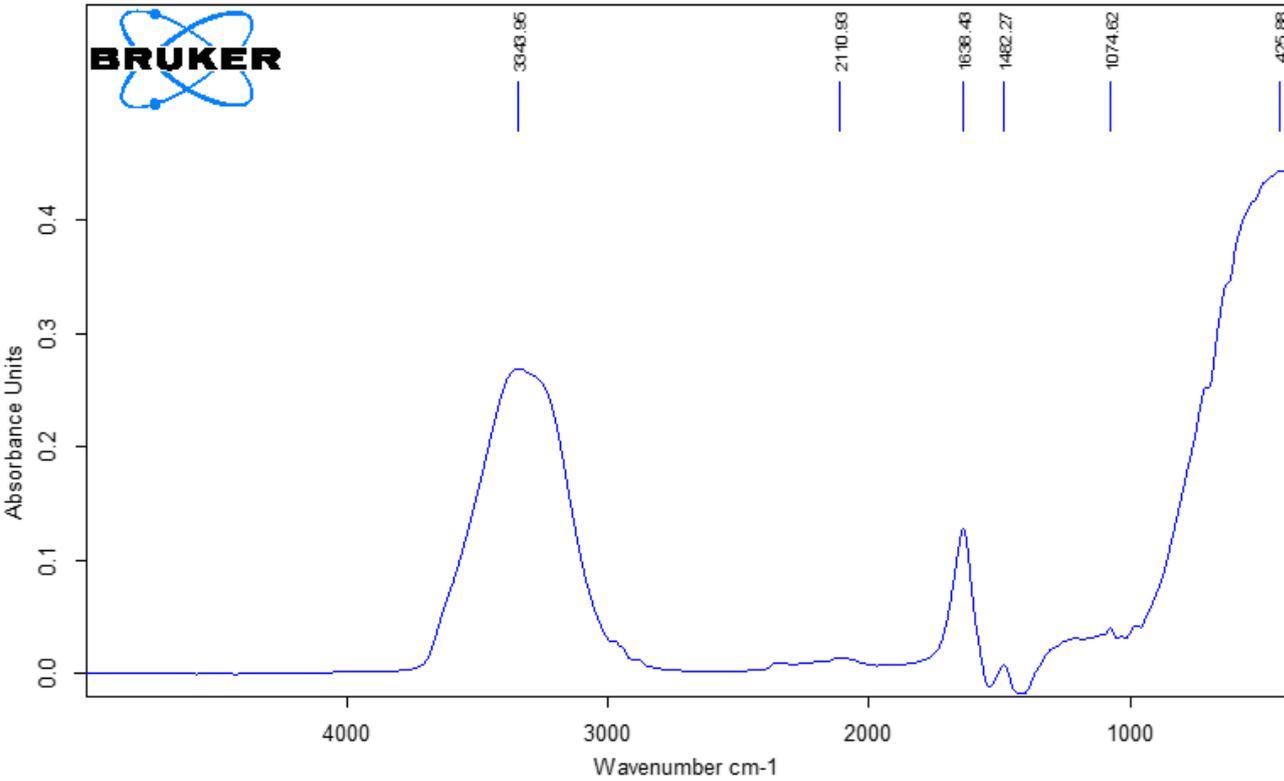
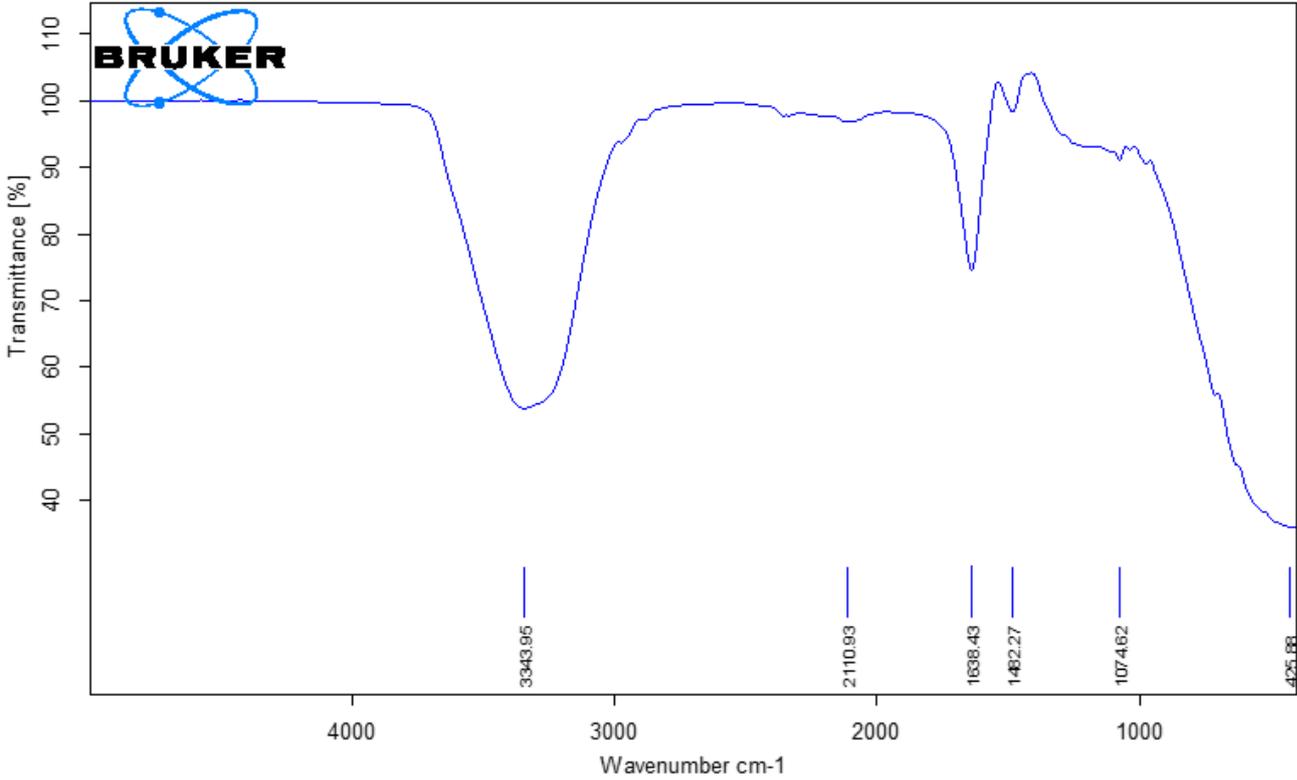
Spectres obtenus par l'analyse FTIR de *Trichoderma sp*

Spectre obtenus par l'analyse FTIR de la phase aqueuse de l'isolat de *Trichoderma*

sp



Spectre obtenu par l'analyse FTIR de la phase organique de l'isolat de *Trichoderma sp.*



Annexe 3

les cépages	1 ^{er} semaine		2 ^{ème} semaine		3 ^{ème} semaine		4 ^{ème} semaine		3 mois	
	inoculé	témoin	inoculé	témoin	inoculé	témoin	inoculé	témoin	inoculé	témoin
Cardinal	1,6	4,96	5,64	6,38	2,96	7,28	3,16	3,46	4,3	8,2
Datole	2,4	2,8	4,56	5	2,68	6,6	2,8	8	4,2	8,76
Victoria	2,82	3	3,06	2,98	3,26	3,16	1,22	4,02	5,84	6,6
Muscat italia	3	3,12	2,78	4	3,74	6,14	2,66	7,94	4,6	6,76
Red glob	2,5	2,6	3,72	6,6	3,72	6,88	3,04	4,94	4,8	6,1
Alphonse lavalloé	2,04	3	2,44	3,034	7,66	5,36	3,96	4,44	3	5,5
Debouki	4,18	3,64	2,04	1,44	3,26	4,08	2,62	5,48	6,58	8,22
Bouture SO4	1,2	3,22	1,52	4,04	2,56	5,02	2,56	3,02	5,04	7,48
1103P	3,52	4,76	1,52	4,02	4,44	4,4	2,94	5,62	5,88	7,6

Tableau : les moyennes des nécroses calculer sur les variétés testées en cm

les cépages	1 ^{er} SEMAINE		2 ^{ème} SEMAINE		3 ^{ème} SEMAINE		4 ^{ème} SEMAINE		3 MOIS	
	inoculé	témoin	inoculé	témoin	inoculé	témoin	inoculé	témoin	inoculé	témoin
cardinal	1,7	5	5,8	6,5	2,5	7,6	3,2	3,5	3	9,5
cardinal	1,8	5	5,5	6	4	7,5	3	3,9	5	8
cardinal	1,6	5,3	5	6,4	2	7,4	3,1	3,4	3,5	8,5
cardinal	1,5	4,9	6,1	6,7	4,1	6,9	3,5	3	4	9,3
cardinal	1,4	4,6	5,8	6,3	2,2	7	3	3,5	6	5,7
datale	2,5	2,8	4,5	5	2,6	6,6	2,8	8	10,5	5
datale	2,3	2,7	4,8	5,5	3	7	2,6	7	2,5	9
datale	2	2,9	4,3	4,6	2,8	6,4	3	7,5	2	10
datale	2,7	2,5	4,2	4,9	2	6,5	3,1	9	3	9,3
datale	2,5	3,1	5	5	3	6,5	2,5	8,5	3	10,5
victoria	2,8	3	3	2,9	3,2	3,1	1	4	7	6
victoria	2,6	3	3,2	3	3	3,3	1,8	3,9	6,5	9
victoria	2,9	3,1	2,8	3,5	3,6	3,5	1,2	4,5	4,7	6,2
victoria	3	2,9	3,3	3,5	3	2,9	1,4	3,7	7	7
victoria	2,8	3	3	2	3,5	3	0,7	4	4	4,8
muscat italia	3	3,2	2,7	4	4,5	6	2,6	8	4,5	7,5
muscat italia	3,2	3	2,5	3,8	4,4	6,2	3	8	5,5	5,3
muscat italia	2,9	2,9	3	3,9	2,4	6	3	7,5	5,5	7
muscat italia	2,7	3,3	2,9	4,3	3,9	7	2,7	8,4	3,5	4
muscat italia	3,2	3,2	2,8	4	3,5	5,5	2	7,8	4	10
red glob	2,5	2,6	3,7	6,5	3,7	6,8	3	5	5	8
red glob	2,8	2,7	3	6,6	3	7	3,3	5,2	3,5	4
red glob	2,2	2,5	4	7	3,9	6,5	2,8	6	5	4,5
red glob	2,4	3	3,2	6,9	4	6,2	3,1	4,5	5	6
red glob	2,6	2,2	4,7	6	4	7,9	3	4	5,5	8
Alphonse lavalleé	2	3	2,5	3	7,5	5,2	4	4,5	4	4
Alphonse lavalleé	2	3,1	2,8	3	7	4,8	4	4,3	2,3	8
Alphonse lavalleé	2,6	2,9	2	2,67	8	5,8	3,9	4,1	3,2	3,9
Alphonse lavalleé	1,7	2,5	2,2	3,5	8,1	6	3,3	5,3	3	4,6
Alphonse lavalleé	1,9	3,5	2,7	3	7,7	5	4,6	4	2,5	7
debouki	4,5	3,8	2	1,5	3,2	4,1	2,4	5,5	5	6
debouki	4	3,3	2,2	2	3,9	5	1,5	5	9	8,4
debouki	4,3	4	1,9	1,2	2,5	3,5	4,2	5,3	6,7	7,2
debouki	3,9	3,3	1,4	1	3,7	4	3	6	6,2	10,5
debouki	4,2	3,8	2,7	1,5	3	3,8	2	5,6	6	9

bouture SO4	1,2	3,3	1,5	4	2,6	5,1	2,7	3	6,5	8,1
bouture SO4	1	3	2	3,5	2,1	4,9	2,5	3,5	4	7
bouture SO4	1,4	3,5	1,4	4,9	3	4,6	2,9	2,5	3,8	7,3
bouture SO4	1,2	3,2	1	4,3	2,8	5,5	2	2,9	6,9	9
bouture SO4	1,2	3,1	1,7	3,5	2,3	5	2,7	3,2	4	6
1103P	3,5	4,7	1,5	4	4,5	4,2	2,9	5,8	6,4	8
1103P	3,8	5,2	1,5	3,9	4,7	4	3,1	5	5	6,7
1103P	3,2	5	1,6	4,5	5	5	2,5	6	6,5	7,5
1103P	3,5	4,9	1	3,6	3,9	4,3	3,2	5,5	5,5	6,8
1103P	3,6	4	2	4,1	4,1	4,5	3	5,8	6	9

Tableau : diamètres des nécroses enregistré pour les variétés testées en cm