

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En Vue De L'obtention Du Diplôme De Master 2

Spécialité : Biotechnologie des plantes aromatiques, médicinales et les produits naturels

Evaluation de l'activité antagoniste de la partie non protéique des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. vis à vis de *Phytophthora infestans* Mont de Bary. agent du mildiou de la pomme de terre

Présenté par : Melle Oussaid Yamina

Devant le jury composé de :

Mr BENDALIA.A	M.A.A	U.S.D.B	Président du jury
Mme MOUMENE. S.	M.C.B	U.S.D.B	Promotrice
Mme SAHRAOUI .F	M.C.B	U.S.D.B	Examinatrice
Melle SADDEK.D	DOCT	U.S.D.B	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015-2016



Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : mes parents qui ont toujours été là pour moi, « Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière ». Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

À mes très chères sœurs Fatiha, Samia et Fatima pour leurs compréhensions, leurs encouragements et leurs aide ainsi que, mon neveu Saleh et ma nièce Meriem que j'aime beaucoup.

À mes grands-parents paternel et maternel qui nous ont quittés à jamais.

À mes tentes, mes oncles, mes cousines et cousins.

À Khalida ,Souhila et Zakia

À tous. mes proches et tous mes amis(es).



Remerciement

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire Centrale de Diagnostic/Institut National de la Protection des Végétaux d'El Harrach (INPV) et au Laboratoire de recherche de l'université de Blida.

Au terme de cette étude, je remercie tout d'abord le dieu tout puissant de m'avoir guidé à suivre le chemin de la science et m'avoir permis la réalisation de ce présent travail. Qui m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

Tout d'abord je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice Mme. Moumene Saida, Maître de conférences à l'université de Blida d'avoir accepté de m'encadrer, diriger et orienter ce travail. Merci de m'avoir donné la chance de travailler sur ce sujet, vous m'avez fait découvert le monde de la chimie.

Je tiens à remercier vivement et chaleureusement Mr Moumene mon ex Directeur Général de l'INPV d'avoir fait confiance à mes capacités scientifiques et mon savoir faire pour être parmi les étudiantes de Mme Moumene et de m'avoir permis la réalisation d'une partie de mon travail au sein de laboratoire de pesticides de l'INPV .Je tiens à vous exprimer l'expression de mes sentiments de reconnaissance de grand respect.

Mes remerciements vont aussi au membre de jury d'avoir ménagé leurs temps pour juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par leurs participations au jury de cette thèse en l'occurrence Mr BENDALI.A.A ,Mme SAHRAOUI .F et Melle SADDEK.D.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers ma Directrice de Laboratoire Central de Diagnostic Mme C. Zouai qui m'a apporté son support moral et encouragements tout au long de ma démarche et qui m'a aidé surtout à la réalisation des analyses chimiques (extraction des métabolites et leurs identification) au niveau de laboratoire des pesticides /INPV merci beaucoup.

Je tiens à remercier Mme Hamdi mon chef de service de mycologie/INPV pour sa compréhension et d'avoir mis à ma disposition tous le matériel, consommable et réactifs nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Je remercie ma sœur Khalida pour son amitié, sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils surtout dans les moments difficiles qu'on a passé ensemble sans oublier toute sa famille.

Je remercie très spécialement Souhila (sousou) qui a toujours été là pour moi. Sa présence dans les moments pénibles comme dans les bons et conseils ont été un sérieux avantage. J'espère garder son amitié pour toujours inshallah.

Un grand merci à Mabdouaa Samira pour tous ces conseils malgré son éloignement.

Mes remerciements vont aussi à Hadjer de laboratoire des pesticides /INPV pour son aide et sa grande disponibilité sans oublier l'équipe de ce laboratoire : Malika, Khadidja, Nassima et Rabiaa pour leurs accueils.

Je remercie Mr Lazar.M pour son aide, ainsi que Mme S. Letifi chef de service laboratoire de bactériologie, de m'avoir permis de réaliser une partie de mon travail au niveau de son laboratoire.

Je remercie aussi Hafida du laboratoire de recherche de l'université de Blida et Mme Boubetra dalila pour leurs gentilleses et leurs disponibilités.

Je remercie Bellatreche.M pour son aide à la réalisation des analyses statistiques, ainsi que, mes collègues et amies pour leur soutien et plus précisément : Lyes Beninal, Djallel, Amina, Zahira, Malika, Farida, et Zahia. Pour leur aide et leur amitié.

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

Sommaire

Résumé français

Résumé anglais

Résumé arabe

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction	1
CHAPITRE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1.1 Aperçu sur la pomme de terre	
1.1.1 Origine et historique de la pomme de terre	3
1.1.2 Description botanique.....	3
1.1.3 Cycle biologique de développement.....	4
1.1.3.1 Phase de germination.....	4
1.1.3.2 Phase de tubérisation	4
1.1.3.3 Phase de repos végétatif	4
1.1.4 Variétés de pomme de terre.....	4
1.1.5 Importance de la pomme de terre.....	5
1.1.6 Situation de la pomme de terre.....	5
1.1.7 Principaux problèmes phytosanitaires de la pomme de terre.....	8
1.2 Généralités sur le mildiou de la pomme de terre.....	10
1.2.1 Symptomatologie.....	10
1.3 Généralités sur l'agent pathogène.....	12
1.3.1 Aspect cultural et morphologique	12
1.3.2 Position taxonomique.....	13
1.3.3 Cycle biologique.....	14
1.3.4 Gamme d'hôtes.....	16
1.4 Lutte contre le mildiou de la pomme de terre.....	16
1.4.1 Lutte prophylactique.....	17
1.4.2 Lutte chimique.....	17
1.4.3 Lutte génétique.....	18
1.4.4 Lutte biologique.....	18

1.5 Généralités sur le genre <i>Trichoderma</i>	19
1.5.1 Historique et taxonomie.....	19
1.5.2 Aspect cultural et Morphologie.....	23
1.5.3 Ecologie.....	23
1.5.4 Intérêt de l'utilisation de <i>Trichoderma</i> spp. dans l'agriculture biologique.....	24
1.6 Modes d'action de <i>Trichoderma</i> spp	25
1.6.1 Mycoparasitisme et enzymes lytiques.....	25
1.6.2 Antibiose et métabolites secondaires.....	26
1.6.3 Compétition pour les nutriments et l'espace.....	26
1.7 Les métabolites secondaires fongiques	26
1.7.1 Production de métabolites utiles par les <i>Trichoderma</i>	27
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	30
2.1 Matériel biologique	30
2.1.1 Matériel fongique.....	30
2.1.2 Matériel végétal.....	30
2.2 Analyse chimique des filtrats de cultures des isolats antagonistes par FTIR	30
2.2.1 Préparation des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	30
2.2.2 Préparation de l'échantillon en pastille de KBr.....	31
2.2.3 Analyse des filtrats de cultures des isolats antagonistes par FTIR.....	31
2.3 Analyse chimique des filtrats de cultures des isolats antagonistes par CGMS	32
2.3.1 Préparation des cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
2.3.2 Extraction des métabolites secondaires.....	32
2.3.3 Séparation et identification des composés par CG-MS.....	33
2.4 Dosage des composés phénoliques	33
2.4.1 Préparation des extraits méthanoliques.....	33
2.4.2 Dosage des phénols totaux.....	34
2.5. Activité antioxydante	34
2.6. Activité antifongique des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur <i>Phytophthora infestans</i>	35
2.6.1 Activité antifongique <i>in vitro</i> des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	35
2.6.1.1 Inhibition de la croissance mycélienne de <i>Phytophthora infestans</i>	35
2.6.1.2 Inhibition de la sporulation et de la germination de <i>Phytophthora infestans</i>	36
2.6.2 Activité antifongique <i>in vivo</i> des extraits de filtrats de cultures des isolats de	37

<i>Trichoderma</i> spp	
2.6.2.1 Préparation du tissu végétal.....	37
2.6.2.2 Inoculation et incubation.....	37
2.6.2.3 Lecture des résultats.....	37
2.7 Analyse statistique.....	38
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	39
3.1 Analyse chimique des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.par FTIR.....	39
3.2 Analyse chimique des extraits des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.par CG-SM.....	42
3.2 .1 Composés identifiés à partir des extraits methanolique des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.par CG-SM.....	42
3.2 .2 Analyse chimique des extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par CG-SM.....	44
3.2.3 Les composés identifiés dans les deux types d' extraits methanoliques et d'hexane...	45
3.3 Activité antioxydante des extraits de filtrats de culture des isolats de <i>Trichoderma</i> spp	50
3.4 Dosage des Phénols totaux des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	51
3.5 Activité antagoniste <i>in vitro</i> des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp	52
3.5.1 Inhibition de la croissance mycélienne de <i>Phytophthora infestans</i>	52
3.5.2 Inhibition de la sporulation et de la germination de <i>Phytophthora infestans</i>	56
3.5.3 Evènements mycoparasitaires des extraits de filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
3.6 Activité antifongique <i>in vivo</i> des extraits de filtrats de culture des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	64
Conclusion.....	65
Références bibliographiques	67
Annexes	

RÉSUMÉ

BROUILLON

Résumé

Evaluation de l'activité antagoniste de la partie non protéique des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp., vis à vis de *Phytophthora infestans* de Bary.

Le présent travail a porté sur l'identification des groupes et des composés chimiques de la partie non protéique des filtrats de cultures de 13 isolats de *Trichoderma* spp. issus d'Algérie ainsi que, l'évaluation de leurs activité antioxydante et antagoniste vis-à-vis de deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*.

L'analyse chimique des extraits butanoliques des filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp. a révélé 18 groupes fonctionnels avec certaines similarités entre l'ensemble des isolats et la dominance des acides, des alcanes, des groupes aromatiques et des alcools par la méthode FTIR ((Infrarouge à Transformée de Fourier) . Par ailleurs, 32 métabolites ont été relevés à partir des extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. avec la dominance du 2H-Pyran-2-one,6-pentyl (6PP) identifié par CG-MS (Chromatographie en phase gazeuse liée à la spectrométrie en masse).

L'activité antioxydante par spectrométrie à UV en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH a affirmé un pouvoir réducteur modéré par rapport à celui de l'acide ascorbique pour les extraits méthanoliques des filtrats de cultures de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp.

Une importante activité antifongique a été confirmée *in vitro* pour les extraits de méthanol et d'hexane des filtrats de cultures de certains isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis des isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans*. Les taux d'inhibition varient entre 98 à 99 % jusqu'à atteindre les 100 % pour la croissance mycélienne, la sporulation et la germination.

L'application des extraits d'hexane et de méthanol des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. sur les disques foliaires sains de pomme de terre ont également prouvé leur pouvoir inhibiteur sur la pathogénicité des deux isolats de *Phytophthora infestans*.

Dans ce sens, les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.: TC ,TE, TG et TK peuvent être préconisés dans la lutte biologique contre le mildiou de la pomme de terre. Cette étude a confirmé donc le potentiel antagoniste de la partie non protéique des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. sur *Phytophthora infestans*

Mots clés: *Phytophthora infestans*, *Trichoderma* spp., CG-MS, FTIR, pouvoir antagoniste.

Abstract

Evaluation of the antagonist activity of the non-protein part of the cultures filtrates of *Trichoderma* spp. Isolates against *Phytophthora infestans* de Bary.

This work focused on identifying groups and chemical compounds of the non-protein part of culture filtrates of 13 isolates of *Trichoderma* spp. issued from Algeria tomato crop rhizosphere and the evaluation of their antioxidant activity and antagonistic towards both A1 and A2 isolates of *P. infestans*.

Chemical analysis of the butanol extracts culture filtrates of isolates of *Trichoderma* spp. revealed 16 functional groups with certain similarities between all isolates and the dominance of acids, alkanes, aromatic groups and alcohols by FTIR (Fourier Transformed Infra Red spectroscopy). Furthermore, 32 metabolites were observed from the methanolic extracts and hexane culture filtrates of *Trichoderma* spp. with the dominance of the 2H-pyran-2-one, 6-pentyl (6PP) identified by GC-MS (Gas chromatography linked to mass spectrometry).

The antioxidant activity by UV spectroscopy using the method of trapping of the free radical DPPH said moderate reducing power compared to ascorbic acid for methanolic extracts of culture filtrates of all isolates of *Trichoderma* spp.

A significant antifungal activity was confirmed *in vitro* for the methanol extract and hexane culture filtrates of certain isolates of *Trichoderma* spp. against A1 and A2 isolates of *Phytophthora infestans*. The inhibition rate ranged between 98 to 99% until 100% for mycelial growth, sporulation and germination.

The application of the hexane extracts and methanol filtrates of cultures of 13 isolates of *Trichoderma* spp. Healthy leaf discs of potato have also shown their inhibitory power on the pathogenicity of the two isolates of *Phytophthora infestans*.

In this sense, the methanol extracts of *Trichoderma* spp. cultures filtrates of isolates: TC, TE, TG and TK can be recommended in the biocontrol of late blight of potato. This study confirmed, therefore, the potential antagonist of the non-protein part of *Trichoderma* spp. culture filtrates against *Phytophthora infestans*.

Keywords: *Phytophthora infestans*, *Trichoderma* spp., GC-MS, FTIR, antagonist power.

تقييم النشاط المضاد للفطر باستعمال الجزء الغير البروتيني لمستخلصات عزلات *Trichoderma spp* ضد

Phytophthora infestans Mont de Bary

تم في هذه الدراسة على الكشف عن مجموعات و مركبات كيميائية لمستخلصات 13 عزلة *Trichoderma spp* أصل جزائري من جهة و من جهة أخرى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة و النشاط المضاد للعزلتين و
A1 لا A2 *Phytophthora infestans*

بينت التحاليل الكيميائية لمستخلصات البوتانول لعزلات *Trichoderma spp* استعمال تقنية FTIR

أنها كما تحتوي على 18 مجموعة كيميائية بوجود تشابه بين العزلات و الاغلبية كانت للأحماض, الالكان, الكحول أن من خلال هذه الدراسة تم الكشف على 32 مركب كيميائي عن طريق مستخلصات الميثانول و لعز Hexane *Trichoderma spp* استعمال تقنية .CG-MS

الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات الميثانول لعزلات *Trichoderma spp* تم تبينها عن طريق استعمال الجذر الحر DPPH

كما أن أظهر النشاط المضاد للفطر باستعمال مستخلصات الميثانول و Hexane لعزلات *Trichoderma spp* عزلات A1 و A2 سط زراعي مخبري أن هذه المستخلصات كانت فعالة جدا و ذلك بتوقيف تكاثر و انبات الأبواغ و نمو الفطر حيث سجلنا نسب مئوية تتراوح ما بين 98%-99 الى غاية 100 بالمئة من جهة أخرى بينت هذه المستخلصات فعاليتها بعدم ظهور أعراض الفطر *P. infestans* قرص أوراق البطاطا.

و بالتالي من خلال هذه النتائج لوحظ أن العزلات TC.TE.TG.TK مكن اختيارها لاستعمالها في المكافحة البيولوجية ضد *P. infestans* هذه بسبب فعاليتها العاليه كما أن هذه الدراسة بينت أن الجزء الغير البروتيني لعزلات *Trichoderma spp* فعالية عالية ضد *P. infestans*

كلمات مفتاح:النشاط المضاد للفطر *Phytophthora infestans*, *Trichoderma spp*, GC-MS, FTIR,

Liste des abréviations

A1 : Isolat de *P. infestans*.

A2 : Isolat de *P. infestans* .

AFC : Analyse factorielle des composés.

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse liée à la spectrométrie en masse

CNCC : Centre National de Certification de Control semences et plants.

DPPH : Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy (Infrarouge à Transformée de Fourier).

GLM : Generalized - Linear Model.

KBr :Potassium bromide.

MADR :Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural et de la pêche.

Na₂ CO₃ : Carbonate de sodium

Nm : Nanomètre .

P.infestans : *Phytophthora infestans*.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PPA : Petit Pois Agar.

T : *Trichoderma* .

TR : Temps de rétention.

Liste des Figures

Figure 1	Symptômes du mildiou sur plants de pomme de terre au champ	11
Figure 2		13
Figure 3	Cycle de développement du mildiou (Haine et Verlainne, 2006)	15
Figure 4	Sections systématiques de <i>Trichoderma</i> spp. et quelques espèces agrégées Rifai (1969 in Bisset, 1991)	21
Figure 5	Analyse factorielle des composés (AFC) des métabolites identifiés à partir des extraits méthanoliques et d'hexanes par la GCMS	40
Figure 6	Activité antioxydante des extraits des filtrats de cultures de <i>Trichoderma</i> spp. selon le modèle GLM .	50
Figure 7	Courbe d'étalonnage d'acide gallique	51
Figure 8	Taux des phénols totaux des extraits des filtrats de cultures <i>Trichoderma</i> spp. selon le modèle GLM	52
Figure 9	Pouvoir inhibiteur de quelques extraits méthanolique et d'hexane des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. sur <i>P.infestans</i>	54
Figure 10	Analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des deux types sexuels de <i>P.infestans</i> sous l'effet des extraits des filtrats de cultures de <i>Trichoderma</i> spp. en modèle GLM	55
Figure 11	Analyse de la variance selon le modèle GLM de l'effet des extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures de <i>Trichoderma</i> spp. sur la sporulation de <i>P .infestans</i> .	57
Figure 12	Analyse de la variance selon le modèle GLM de l'effet des extraits d'hexane des filtrats de cultures de <i>Trichoderma</i> spp. sur la germination de <i>P. infestans</i>	58
Figure 13	Analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination de <i>P. infestans</i> en modèle GLM selon les types d'extraits.	59
Figure 14	Modification morphologique des isolats de <i>P.infestans</i> sous l'effet des Extraits méthanolique et d'Hexane	60
Figure 15	Pouvoir pathogène de <i>P.infestans</i> sous l'effet des extraits méthanoliques et d'hexane	64

Liste des tableaux

Tableau 1	Evolution de la production mondiale de pomme de terre entre 2003 et 2013. FAOSTAT (2015)	06
Tableau 2	Evolution de la production nationale de pomme de terre entre 2003 et 2013. FAOSTAT (2015)	07
Tableau 3	Les principaux agents pathogènes infectant la pomme de terre	09
Tableau 4	Groupes fonctionnels identifiés à partir des extraits des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp	39
Tableau 5	Analyse chimique des extraits methanoliques des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par la CG-SM	43
Tableau 6	Analyse chimique des extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. par la CG-SM	44

Liste des annexes

Annexe 1	Composition du milieu de culture petits pois et PDA	93
Annexe 2	Spectres obtenus par l'analyse FTIR de chaque isolats de <i>Trichoderma</i> spp	94
Annexe 3	Spectres obtenus par l'analyse CG-MS des extraits methanoliques de chaque isolats de <i>Trichoderma</i> spp	98
Annexe 4	Spectres obtenus par l'analyse CG-MS des extraits d'hexanes de chaque isolats de <i>Trichoderma</i> spp	103
Annexe 5	Dosage des phénols et activité antioxydante des extraits des filtrats de culture de <i>Trichoderma</i> spp	108
Annexe 6	Analyse de la variance de la croissance mycélienne ,sporulation et germination des deux types sexuels A1 et A2	109

INTRODUCTION

BROUILLON

Introduction

La pomme de terre occupe une place très importante dans l'alimentation humaine (Alloy.,2009).C' est une culture stratégique de par sa position dans le monde où elle occupe la quatrième place après les cultures de blé, de riz et de maïs. En Algérie, la pomme de terre se classe en tête des cultures maraîchères, tant sur le plan superficiel que par le niveau de production (Badaoui et al., 2011).cette culture est sujette à plusieurs attaques des ravageurs et maladies fongiques telle que le mildiou (*Phytophthora infestans*) ,qui est une maladie cryptogamique redoutable de la pomme de terre.

Dans les années 1840, *P. infestans* a provoqué la grande famine européenne marquée par la mort d'un million d'Irlandais et l'exil d'un autre million et demi (Mercure et al., 1998).

Ces dernières années, des souches extrêmement agressives, la plupart résistantes aux fongicides synthétiques courants ont fait leur apparition, créant de nouveaux défis pour les producteurs de pommes de terre et de tomates. Elle peut détruire toute une récolte et se traduire par une perte complète de rendement (Kuepper et Preston, 2004).

En effet, cette dernière peut atteindre les 100%, et en moins de trois semaines, une culture de pomme de terre peut être entièrement détruite (Gaucher et al. ,1998). Les attaques précoces induisent une diminution de la photosynthèse, alors que les attaques tardives conduisent à une baisse de la qualité des tubercules (Radtke et Rieckmann, 1991 ; Dubois, 2009)

En 2007, les variations climatiques ayant caractérisé le mois de mars avec alternance de pluies fortes et température supérieure à 15°C, ont favorisé et accéléré l'apparition d'une forte épidémie du mildiou durant le printemps, surtout dans l'Ouest du pays où les dégâts les plus importants sur culture ont été enregistrés. D'après Le Quotidien d'Oran 75 % de la récolte de la pomme de terre de consommation a été détruite par le mildiou en 2006, dans la wilaya de Mostaganem, principalement à Sirat et Bouguirat.

De ce fait, l'INPV a lancé une enquête sur cette maladie depuis 2010-2013 en collaboration avec 8 stations régionales situées à l'est, centre et ouest du pays dont les objectifs étaient de dépister la présence de la souche de type A2 au niveau des zones à vocation pomme de terre afin d'établir une carte phytosanitaire représentative des zones révélant la présence de la souche A2 et évaluer l'incidence des traitements sur le développement de la maladie (INPV, 2013).

La lutte contre le mildiou de la pomme de terre le plus souvent fait recours à la lutte chimique en utilisant par alternance des produits de contact et systémiques. Toutefois, l'utilisation massive

de fongicides systémiques a conduit à la sélection d'isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides (métalaxyl) (Gisi et Cohen., 1996).

Aussi, la lutte biologique représente donc, une approche novatrice à la gestion des maladies des plantes d'importance agricole, qui est basé sur la capacité d'un organisme à détruire les agents phytopathogènes ou à inhiber leur croissance (Whipps et Lumsden, 2001).

En effet, certaines espèces de *Trichoderma* ont été évaluées comme agents de lutte biologique en raison de leur capacité antagoniste et hyperparasite (Harman *et al.*, 2004; Benitez *et al.*, 2004; Ávila-Miranda *et al.*, 2006)

Dans ce sens ,notre travail est consacré à l'étude de la partie non protéique des isolats de *Trichoderma* spp . il s'articule autour des points suivants :

- Extraction des métabolites secondaires des isolats de *Trichoderma* spp. issus d'Algérie,
- Identification des groupes et des composés chimiques des isolats de *Trichoderma* spp,
- Evaluation de leur activité antioxydante et antagoniste *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de deux types sexuels A1 et A2 de *P. infestans* ont. de Bary. agent responsable du mildiou de la pomme de terre.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

1.2 Aperçu sur la pomme de terre

1.1.1 Origine et historique de la pomme de terre

La pomme de terre est originaire des hauts plateaux andins de la cordillère des Andes (Hawkes, 1990). Elle fut introduite en Europe par l'Espagne au milieu du XVI^{ème} siècle. Ce n'est qu'à la fin du XVIII^{ème} siècle qu'elle figure dans l'alimentation humaine en France (Spire et Rousselle, 1996 in Montarry, 2007). Propagée aussi bien par les anglais que par les espagnoles, la pomme de terre a gagné le reste de l'Europe (Robuchon, 1994 ; Rousselle et al., 1996). Depuis, elle s'est répandue dans le monde entier

Cette culture a été ramenée et propagée par les andalous en Algérie. Elle a été faite par les français en 1856 et en 1898, mais notre pays était déjà un pays importateur de pomme de terre de consommation (Inva, 2007 ; Carrier, 2008).

1.1.2 Description botanique

La pomme de terre appartient à la famille des Solanacées. C'est une espèce à multiplication végétative, cultivée pour ses tubercules, organes de réserve et de multiplication riches en substances nutritives, majoritairement glucidiques (amidon) (Soltner, 2005).

C'est une plante herbacée, tubéreuse, vivace, mais cultivée comme une plante annuelle. Son système racinaire est fasciculé et très ramifié. Il a tendance à s'étendre superficiellement mais peut s'enfoncer jusqu'à 0,8 mètre de profondeur. Il est constitué de racines adventives qui apparaissent à la base des bourgeons du tubercule ou sur les nœuds des tiges enterrées. Pour cette raison, le tubercule doit être planté à une profondeur telle qu'elle permette une formation adéquate des racines et des stolons (Bock, 2012).

Les tubercules sont comestibles, de taille variable et de forme oblongue, plus ou moins allongée, cylindrique, lisse ou bosselée selon les variétés. A leur surface, on peut observer des yeux alignés sur cinq génératrices et disposés selon une courbe hélicoïdale qui court depuis la cicatrice basale jusqu'à l'apex. La couleur de la peau est généralement jaune, mais peut être rouge, noire, ou rose. La couleur de la chair est blanche, jaune plus ou moins foncé, rose ou violette selon les variétés (Bock, 2012).

Les feuilles sont caduques, alternes et, vont de dix à vingt centimètres de long. Elles sont insérées sur la tige selon une phyllotaxie spiralée et comptent 7 à 9 folioles de forme lancéolée et de taille hétérogène, les plus petites folioles s'intercalent par paires entre les plus grandes. Les

feuilles basales peuvent parfois être entières. Elles présentent des poils ou trichomes à leur surface, en quantité variable selon les cultivars (Bock, 2012).

L'inflorescence est une cyme qui naît à l'extrémité de la tige. Elle compte d'une à trente fleurs, généralement entre 7 et 15. Le nombre d'inflorescences et le nombre de fleurs par inflorescence varient fortement selon les cultivars. Le fruit de la pomme de terre est une baie qui ressemble à une petite tomate. Il n'est pas comestible. Sa forme peut être sphérique, allongée ou ovoïde. Son diamètre varie généralement de 1 à 3 cm et sa couleur peut aller du vert au jaunâtre, ou du marron rougeâtre au violet (Bock, 2012)

1.1.3 Cycle biologique de développement

La pomme de terre est une espèce à multiplication végétative. Sa reproduction est assurée par un tubercule. (Rousselle et *al.*, 1996). Le cycle de la pomme de terre dure trois à quatre mois, depuis le semis jusqu'à la destruction de l'appareil végétatif (Martin, 2004). Il se déroule en trois phases principales :

1.1.3.1 Phase de germination

Lorsqu'un tubercule germé est planté en terre, ses germes se transforment en tiges feuillées qui donnent au-dessus du sol, des rameaux et en dessous des stolons (Madec, 1966 in Montarry, 2007).

1.1.3.2 Phase de tubérisation

Elle commence par l'arrêt de l'élongation des stolons et la formation des ébauches des tubercules, qui une fois différenciés, vont grossir en emmagasinant des substances de réserve formées à partir des métabolites synthétisés par la plante au niveau du feuillage (Jolivet, 1969 in Montarry, 2007). La maturation des tubercules se traduit par un jaunissement du feuillage suivi d'un dessèchement total du système aérien.

1.1.3.3 Phase de repos végétatif

Après la récolte, durant cette phase, les tubercules même placés dans des conditions optimales de température et d'humidité, leurs bourgeons sont incapables de croître pour produire des germes. A la fin du repos végétatif, le germe entre en croissance s'il n'y a pas de dormance induite par les conditions du milieu (Madec, 1966 in Montarry, 2007).

1.1.4 Variétés de pomme de terre

Chaque année de nouvelles variétés font leur apparition alors que d'autres tombent dans l'oubli

(Laumonier, 1979). D'après le Guide d'identification et fiches descriptives de Arvalis (2008), il existe des milliers de variétés, qui sont très différentes de par leur taille, leur forme, leur couleur, leur usage culinaire et leur goût. La classification variétale repose sur une des descriptions officielles basées sur de nombreux caractères morphologiques et quelques caractères physiologiques qui leur permettent d'être identifiables visuellement des autres variétés (Perón, 2006).

En Algérie, le nombre de variétés de pomme de terre multipliées reste très limité. En effet, sur les 122 variétés inscrites dans les listes provisoires parues dans le journal officiel n° 07 du 28 janvier 2009, environ 20 variétés sont multipliées, dont huit variétés à peau rouge (Désirée, Kondor, Bartina, Pamela, Rubis, Rodeo, Amorosa, Sarpo Mira) et douze à peau blanche (Spunta, Atlas, Timate, Fabula, Arnova, Valor, Liseta, Burren, Safrane, Escort, Alaska, Ditta, Arinda) (CNCC, 2010).

1.1.5 Importance de la pomme de terre

La pomme de terre représente une bonne source d'énergie grâce à l'amidon renfermé dans son tubercule, elle contient environ 90 kcal pour 100 g. En comparaison à d'autres céréales, elle est peu calorique (100 et 250 Kcal pour le pain, les pâtes et le riz) (Oswaldo, 2010).

Elle est également, pleine de vitamines et minéraux essentiels. La pomme de terre apporte les vitamines : B1, B2, B5, B6, B9, K et C. Elle contient aussi une quantité importante de fer manganèse et potassium.

1.1.6 Situation de la pomme de terre

La pomme de terre est cultivée dans plus de 150 pays. Elle joue un rôle clé dans le système alimentaire mondial. C'est la principale denrée alimentaire non céréalière du monde qui vient en quatrième position après le blé, le riz et le maïs qui constituent la base de l'alimentation humaine. (FAOSTAT, 2015).

En 2013, la production mondiale de pommes de terre est estimée à 368.1 millions de tonnes, pour une surface cultivée de 19.4 millions d'hectares, soit un rendement moyen de 18.9 tonne par hectare. Ce chiffre n'inclut pas les plants (semences) qui représentent 32.2 millions de tonnes. C'est la Chine qui occupe le premier rang des pays producteurs avec une production qui atteint 88.9 millions de tonnes en 2013 (Tableau 1) (FAOSTAT, 2015).

Le tableau ci-dessous représente l'évolution de la surface cultivée en pomme de terre, la production et le rendement par hectare ainsi que la quantité de semence produite dans le monde

durant la dernière décennie (2003-2013).

Tableau 1 : Evolution de la production mondiale de pomme de terre entre 2003 et 2013.

Années	Surface cultivée (M ha)	Production (Mt)	Rendement (t/ha)	Semences (Mt)
2003	19.1	314.8	16.4	34.8
2004	19.2	336.2	17.5	34.6
2005	19.3	326.7	16.8	32.6
2006	18.4	307.3	16.7	32.9
2007	18.6	323.9	17.3	30.8
2008	18.1	329.9	18.1	31.5
2009	18.7	334.7	17.9	32.3
2010	18.7	333.4	17.8	32.7
2011	19.2	374.2	19.4	32.9
2012	19.2	364.8	19.0	28.1
2013	19.4	368.1	18.9	32.2

(FAOSTAT, 2015).

En 2013, l'Algérie a occupé la deuxième place, après l'Egypte, dans la production de la pomme de terre en Afrique. La production nationale durant la dernière décennie (2003-2013) a augmenté de 1 879 918 tonnes en 2003 à 4 400 000 tonnes en 2013 pour une augmentation de la surface cultivée de 88 660 hectares en 2003 à 140 000 hectares en 2013. L'accroissement du rendement est aussi très significatif de 21.20 tonnes par hectare en 2003 à 31.43 tonnes par hectare en 2013 ; c'est en dehors de la production de semences qui montre une nette augmentation durant cette période (Tableau 2) (FAOSTAT, 2015).

Tableau 2 : Evolution de la production nationale de pomme de terre entre 2003 et 2013.

Années	Surface cultivée (ha)	Production (t)	Rendement (t/ha)	Semences (t)
2003	88 660	1 879 918	21.20	99 664
2004	93 144	1 896 270	20.35	106 697
2005	99 717	2 156 550	21.62	105 743
2006	98 825	2 180 961	22.06	84 893
2007	79 339	1 506 859	18.99	98 270
2008	91 841	2 171 058	23.64	112 479
2009	105 121	2 636 057	25.07	130 536
2010	121 996	3 300 312	27.05	141 136
2011	131 903	3 862 194	29.28	148 373
2012	138 666	4 219 476	30.43	148 373
2013	140 000	4 400 000	31.43	149 800

(FAOSTAT, 2015).

Malgré cette nette augmentation des rendements, la production nationale n'arrive pas à satisfaire les besoins nationaux en semences de pomme de terre. Rappelons que 80% des besoins en semences proviennent de l'importation (d'un montant de 60 millions d'Euros) ; signalons également que l'auto approvisionnement en semences représenterait un taux variant entre 10 et 20% de la production locale, ce volet ne concerne que la tranche d'arrière-saison et une partie de la tranche primeur (MADR, 2010).

Pour la première fois de son histoire, l'Algérie a produit, en 2013, plus de pomme de terre que de céréales. Selon les bilans publiés par le ministère de l'agriculture, le pays a produit 45 millions de quintaux de pomme de terre, un nouveau record, contre 44 millions de quintaux de céréales.

La pomme de terre est cultivée sur tout le territoire, y compris dans les oasis du sud du pays, avec l'apparition récente du bassin spécifique d'El Oued, où la pomme de terre est devenue une spéculation majeure en quelques années.

En Algérie la pomme de terre est cultivée selon trois types de culture qui sont : la saison,

l'arrière-saison et la primeur, on enregistre des plantations durant pratiquement toute l'année, à l'exception des mois de mai et juin (Amrar, 2005).

Ces périodes de plantations s'étalent durant l'année comme suit :

- De janvier à début avril pour la culture de saison ;
- De juillet à septembre pour la culture d'arrière-saison ;
- D'octobre à décembre pour la culture de primeur.

Par tranche de culture la production est répartie comme suit :

- Arrière-saison : 1,6 million de tonnes.
- Primeur : 0,14 million de tonnes.
- Saison : 2,2 millions de tonnes.
- semence : 0,45 million de tonnes.

Cependant, si l'on retient les quinze wilayate où elle occupe plus d'un millier d'hectares, on pourra alors distinguer dans les zones du littoral et du sub-littoral, trois bassins de production (Chehat, 2008) :

- l'Ouest, constitué par les wilayate de Tlemcen, Mostaganem et Chlef ;
- Centre, regroupant les wilayate d'Ain Defla, Tipaza, Alger, Boumerdes, Bouira et Tizi-Ouzou ;
- l'Est, représenté par la wilaya de Skikda sur le littoral et de Guelma, Setif, Mila et Batna à l'intérieur.

Selon MADR, la production nationale de pomme de terre a doublé entre 2009 (2,6 millions de quintaux) et 2015 (4,5 millions qx) avec une extension des superficies de 105 000 ha en 2009 à 151 000 ha en 2015.

1.1.7 Principaux problèmes phytosanitaires de la pomme de terre

Les maladies occasionnées sur la culture de pomme de terre peuvent toucher tous les organes de la plante en cours de végétation, aussi bien que les tubercules en phase de stockage (Tableau 3). Les dommages économiques peuvent être très importants, provenant aussi bien de la diminution, voire la destruction totale de la récolte, que de la baisse de qualité qui peut conduire à des déclassements importants, notamment pour la production de pommes de terre de semences. Les principaux problèmes phytosanitaires rencontrés sur pomme de terre selon; Radtke et Rieckmann, 1991 ; Reckhaus, 1997 ; Struik et Wiersema, 1999 ; Mulder et turkensteen, 2005 ; Gnis et Arvalis, 2008; Ait ouada et al., 2008 sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Les principaux agents pathogènes infectant la pomme de terre

Origine	Maladies	Agent causal
Maladies fongiques	Rhizoctone brun	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.
	Dartrose	<i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) S.J. Hughes
	Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary
	Alternariose	<i>Alternaria solani</i> Sorauer. et <i>Alternaria alternata</i>
	Sclerotiniose	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
	Verticilliose	<i>Verticillium</i> spp
	Fusariose	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht
	Gangrène	<i>Phoma exigua</i> var <i>exigua</i> Sacc.
	gale argenté	<i>Helminthosporium solani</i>
	Oosporiose	<i>Polyscytalum pustulans</i> (Owen et Wakefield) Ellis
	Gale poudreuse	<i>Spongospora subterranea</i> (Wallr.) Lagerh.
	Gale verruqueuses	<i>Synchytrium endobioticum</i> Schilb
	Pourriture rose	<i>Phytophthora</i>
	Rhizoctone violet	<i>Rhizoctonia crocorum</i> Pers.
	Pourriture sèche	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. <i>Fusarium roseum</i>
Maladies virales	PVY genre Potyvirus	Le virus Y de la pomme de terre
	PVX genre Potexvirus	Le virus X de la pomme de terre
	PLRV genre Luteovirus	Le virus de l'enroulement de la pomme de terre
	PVS genre Potyvirus	Le virus S de la pomme de terre
	PVA genre Potyvirus	Le virus A de la pomme de terre
Maladies bactériennes	Flétrissement bactérien	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	Jambe noire	<i>Erwinia carotovora</i>
	Flétrissement bactérien	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
	Gale commune	<i>Streptomyces scabiei</i>
Maladies nématodes	Nématodes à kyste	<i>Globodera pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i>
	Nématodes à galles	<i>Meloidogyne</i> spp.
Insectes	La teigne	<i>Phythoraimeaoperculella</i>
	Doryphore	<i>Leptinotarsadecemlineata</i>

1.2 Généralités sur le mildiou de la pomme de terre

Le mildiou, causé par *P. infestans*, est une maladie très redoutable de la pomme de terre et de la tomate non seulement dans les régions tempérées mais pratiquement dans toutes les zones de production de ces cultures (Fry et al., 1992). Cette maladie n'a pas cessé de faire couler l'encre depuis son apparition dramatique en Irlande en 1845-46 où elle a provoqué une grande famine qui a entraîné la mort de plus d'un million d'habitants et la migration de plus d'un million et demi de personnes (Fry et Goodwin, 1997 ; Andrivon et Lebreton, 1998). Le centre d'origine de cette maladie est probablement les montagnes du Mexique Centrale (Niederhausser, 1991 ; Christine et al., 2000) où la diversité du parasite est maximale et où la reproduction sexuée du champignon a toujours existé (Tooley et al., 1986). Ensuite, la maladie s'est manifestée en dehors du Mexique après migration en plusieurs temps (Spielmen et al., 1991 ; Fry et al., 1992 ; Goodwin et al., 1993 ; Andrivon, 1996). En Afrique, la maladie a été détectée pour la première fois en 1941 (Sediqui et al., 1997).

1.2.1 Symptomatologie

P. infestans l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre attaque toutes les parties de la plante : les jeunes pousses, les feuilles, les pétioles, les bouquets terminaux, les tiges et les tubercules (Radtke et Rieckmann, 1991).

Au stade précoce, les petites feuilles des jeunes pousses brunissent et se dessèchent rapidement si les conditions d'infection sont favorables. Aux stades végétatifs plus avancés, l'infection se manifeste sur les tiges par des nécroses qui se répartissent longitudinalement en différentes zones (Figure 1). Ces nécroses s'étendent, brunissent et provoquent souvent l'affaissement des fanes (Paitier, 1980). Les attaques précoces induisent surtout une diminution de la photosynthèse, alors que les attaques tardives conduisent à une baisse de la qualité des tubercules (Radtke et Rieckmann, 1991).

Sur la face supérieure des feuilles, on observe l'apparition de petites taches décolorées qui brunissent et entourées d'un halo jaune d'aspect huileux. Sur la face inférieure, les fructifications de l'agent pathogène (sporangies et sporangiophores) apparaissent sur le pourtour des taches et donnent un feutrage blanc caractéristique en conditions humides (Gnis et Arvalis, 2008). Ces taches se développent souvent depuis l'extrémité ou depuis les bords de la feuille et s'agrandissent rapidement (Radtke et Rieckmann, 1991).

Les attaques sur bouquets terminaux se manifestent par un brunissement et un léger recroquevillement des feuilles apicales. La multiplication du nombre de taches, leur extension puis leur dessèchement peut conduire rapidement à la destruction du feuillage (*Gnis et Arvalis*, 2008).

Le symptôme typique sur tige est une nécrose brune violacée, s'étendant sur 2 à 10 cm à partir d'un noeud. Par temps humide, cette nécrose se couvre d'une pulvérulence blanche ou grisâtre, constituée d'organes de multiplication du pathogène (Rousselle et *al.*, 1996). L'infection des tubercules se manifeste sur la peau par des lésions grisâtres irrégulières, tandis que la chair présente une altération de couleur brunâtre avec une texture souvent granuleuse. Il en résulte une pourriture sèche (Thurston et Shultz, 1981 ; Henfling, 1987) (Figure 1).

Figure 1 : Symptômes du mildiou sur plants de pomme de terre en plein champ

a,b : Symptômes du mildiou en plein champ c : Symptômes du mildiou sur plant
d,c: Symptômes du mildiou sur tige et feuilles f : Symptômes du mildiou sur tubercules

1.3 Généralités sur l'agent pathogène

Montagne (1845) a donné pour la première fois le nom de *Botrytis infestans* (Mont.) comme l'agent pathogène responsable de la maladie du mildiou, puis de Bary. en 1863, la transféré au genre *Peronospora* d'où le nom de *Peronospora infestans* (Mont.) de Bary. et ce n'est que vers 1876, que de Bary. Le transféra au genre *Phytophthora*, caractérisant ainsi l'agent pathogène qui cause la maladie du mildiou de la pomme de terre. Le terme *Phytophthora*, signifie « destruction des plantes » (Mulder et turkensteen, 2005).

C'est une espèce hétérothallique incapable de se reproduire sexuellement sans la présence des deux types de compatibilité sexuelle opposés (A1 et A2) pour donner la formation d'oospores (Smoot et *al.*, 1958). Ces dernières peuvent passer l'hiver dans le sol sans avoir besoin de tissus végétaux de l'hôte, et donner un inoculum infectieux.

Rappelons que, ces deux types de compatibilité sexuelle coexistaient depuis longtemps au Mexique, et la détection du type A2 n'a été rapportée, en dehors de son pays d'origine, en Europe, qu'à partir des années 1981 (Hohl et Islin, 1984 ; Drenth et *al.*, 1993).

1.3.1 Aspect cultural et morphologique

Phytophthora infestans se comporte dans la nature comme un biotrophe obligatoire (Isaac, 1992 ; Kosack et Parker, 2003), mais il peut tout de même être isolé et cultivé en milieu de culture artificiel (Adrion, 1995) (Figure 2).

P. infestans , possède un mycélium coenocétique hyalin et présente un développement endogène via la formation d'haustoria (Thurston et Shultz, 1981).

Le caractère morphologique principal de ce pathogène est la présence de renflement ou de gonflement au niveau des sites de ramification en particulier aux points de la formation des sporocystes (Thurston et Schltz, 1981) .Ces derniers en position terminale ont une forme et une taille qui varie selon les isolats. Les sporanges sont citrifformes ou limoniformes possédant une papille apicale.

Ces derniers renferment des cellules mobiles appelées zoospores qui assurent la reproduction asexuée. Ces zoospores se déplacent grâce à deux flagelles dissemblables, le flagelle orienté postérieurement est lisse et celui orienté antérieurement est couvert de poils particuliers§. (Bouchet et *al.*, 2000).

Les oospores sont pour la plupart de forme aplerotique avec un diamètre moyen d'environ 30 µm (Gallegly et Hong, 2008). Ces derniers en germant produisent des sporanges. Les oogones sont globuleuses, d'un diamètre de 37 µm, alors que les anthéridies sont amphygynes et généralement et de forme allongée (Gallegly et hong, 2008).

Figure 2 : Aspect cultural et morphologique de *Phytophthora infestans*

1.3.2 Position taxonomique

P. infestans est un Oomycète de la famille des Pythiacées (Agrios, 1997). Les Oomycètes sont des Straminopyles, plus proches des algues brunes que des champignons supérieurs (Kroon et al., 2004 ; Avila-Adame et al., 2006) in Montarry, 2007).

Selon Kirk et al. (2008), la classification de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary est comme suit :

- **Règne** : Chromistan ou Straminopila
- **Phylum** : Oomycota
- **Classe** : Peronosporae
- **Ordre** : Peronosporales
- **Famille** : Peronosporaceae
- **Genre** : *Phytophthora*
- **Espèce** : *Phytophthora infestans*

1.3.3 Cycle biologique

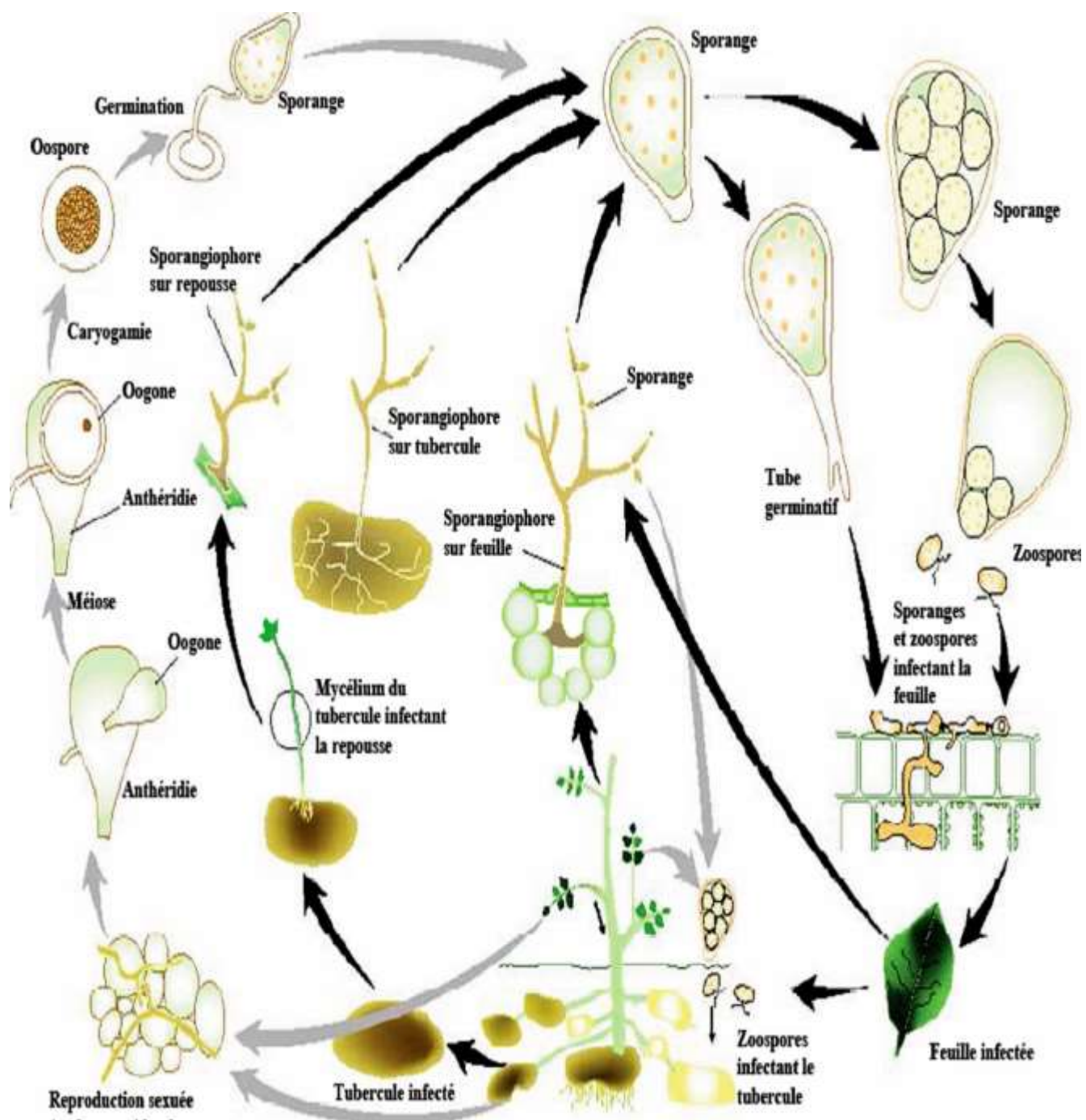
Le cycle de vie de *P. infestans* comporte une phase asexuée et une autre sexuée (Figure 3). Les sporocystes constituent l'unité de la reproduction asexuée. Ces organes sont facilement détachés des sporangiophores qui constituent un duvet blanc autour des lésions. Les sporocystes germent soit directement par émission d'un ou de plusieurs tubes germinatifs soit indirectement par la production des zoospores (Harrison, 1990). Ces propagules seront à l'origine des contaminations secondaires. L'infection des tubercules se fait souvent par les zoospores de *P. infestans* qui sont facilement drainés avec l'eau d'irrigation ou des précipitations. Le pathogène infecte les tubercules au niveau des lenticelles, des yeux, des stolons ou des blessures mais ne pénètre jamais à travers le épiderme intact (Walmsley-Woodward et Lewis, 1977 ; Pathak et Clarke, 1987). L'importance relative des différentes voies de pénétration du pathogène dans les tubercules dépendent des conditions de la croissance et le type de cultivar (Swizynsky et Zimnoch-Guzowska, 2001).

P. infestans est hétérothallique et se caractérise par l'existence de deux types sexuels A1 et A2 (Gallegly et Galindo, 1958, Smoot et al., 1958). Après confrontation entre les anthéridies et les oogones, les oospores sont formés selon les réactions de chacun des types sexuels vis à vis de l'hormone produite par le type sexuel opposé (Ko, 1988 ; Shaw, 1987). Les oospores

peuvent être formés selon trois mécanismes différents : par apomixie, autogamie ou par reproduction sexuée croisée. Cependant, l'importance relative des oospores formées par ces trois voies reste indéterminées (Christine et *al.*, 2000).

Haine et Verlainne (2006), distinguent trois périodes dans le cycle global du mildiou durant une année : la survie hivernale, l'installation de l'inoculum primaire au printemps et la multiplication des cycles et extension de la maladie en été. L'évolution des épidémies se réalise par succession de cycles de multiplication du mildiou qu'on peut résumer comme suit :

- Contamination : dispersion des spores, germination et pénétration dans les tissus de la plante
- Incubation : évolution du *Phytophthora* dans les tissus de la plante, sans manifestation extérieure
- Sporulation : éclosion et fructification.



→ Reproduction sexuée

→ Reproduction asexuée

Figure 3 : Cycle de développement du mildiou (Haine et Verlainne, 2006)

1.3.4 Gamme d'hôtes

En plus de la pomme de terre et de la tomate, plusieurs Solanacées constituent des hôtes préférés de *P. infestans* (Christine et al., 2000). Cependant, cette pathogénicité ne se limite pas seulement aux grandes cultures naturelles. En effet, plusieurs autres cultures appartenant à d'autres genres et espèces d'arbres tropicaux et arbustes se sont révélées des hôtes pour ce pathogène (Vartanian et Endo, 1985).

Erwin et Ribeiro (1996) ont rapporté que les inoculations artificielles au laboratoire ou les observations en plein champ, ont révélé que le pathogène peut attaquer 89 espèces. Christine et al.(2000) ont conclu que la large apparition récente de nouveaux génotypes de *P. infestans*, a contribué à l'élargissement de la gamme hôtes de ce pathogène. Aux Etats Unis, plusieurs investigations ont confirmé que la Morelle (*S. sarachioides*) petunia (*Petunia hybrida*) et l'aigre-doux (*S. bulcamara*) constituent aussi des hôtes pour ce pathogène (Laing, 1998). Christine et al. (2000) ont conclu que la large apparition de nouveaux génotypes de *P. infestans* a contribué à l'élargissement de la gamme d'hôtes de ce pathogène.

1.4 Lutte contre le mildiou de la pomme de terre

La lutte contre le mildiou de la pomme de terre doit être obligatoirement préventive.

La priorité de la stratégie est d'empêcher autant que possible l'implantation du pathogène dans la parcelle (Rousselle et al., 1996). Lorsque les infections sont déclarées, il faut limiter le plus possible le développement pour préserver le feuillage, mais aussi pour éviter la contamination ultérieure des tubercules. En effet, plusieurs méthodes de lutte peuvent être préconisées.

1.4.1 Lutte prophylactique

Certaines pratiques culturales peuvent contribuer à réduire les sources d'inoculum primaire et/ou la propagation de la maladie. Ces mesures peuvent être récapitulées dans les points suivants :

- L'utilisation des semences de la pomme de terre saines et certifiées (Laing, 1998).
- L'élimination des déchets de triage et les repousses de la culture précédente (Henfling, 1987 ; Laing, 1998). L'incinération des déchets peuvent aussi être utilisés comme source de pâturage pour les animaux. Néanmoins, l'incinération de ces déchets s'avère le moyen le plus efficace pour détruire ou diminuer la quantité d'inoculum formé durant la saison agricole précédente.
- L'assainissement du matériel et des installations d'entreposage (Laing, 1998).
- Le défanage précoce et total permet souvent d'éradiquer la contamination ultérieure des tubercules-fils (Duvauchelle et Andrivon, 1996).
- L'utilisation d'une ou plusieurs cultures non hôtes de *P. infestans* dans le cycle de rotation limite la propagation de l'infection vers d'autres régions encore vierges (Paitier, 1980).

1.4.2 Lutte chimique

La lutte chimique est basée sur des traitements préventifs, avec l'utilisation par alternance de fongicides de contact et systémiques (Gaucher et *al.*, 1998).

En culture, l'application des produits de contact se fait lorsque les plants ont une hauteur de 10 à 15 cm. Ces applications doivent être répétées régulièrement en cas de formation des nouvelles feuilles. Les applications des fongicides systémiques sont assurées en période de forte croissance de la plante jusqu'au défanage afin d'éviter les risques du développement des spores et leurs descentes vers les tubercules. Une fois que le mildiou apparait, nous devons raccourcir les intervalles d'applications des traitements fongicides en tenant compte de la rémanence de chaque produit utilisé. Des systèmes de prévisions des risques ont été développés afin de rationaliser l'utilisation des traitements chimiques. Ils sont basés sur le développement de modèles, tels «Guntz et Divoux» utilisés en France depuis 1963, ou «Blitecast» utilisés aux Etats-Unis, et fondés sur la prévision des périodes climatiques favorables aux contaminations (Montarry,2007).

1.4.3 Lutte génétique

La meilleure alternative à l'utilisation des fongicides est la lutte génétique. De nombreux programmes reposant sur l'introduction de gènes de résistance ont été engagés, pour la sélection de variétés de bonne valeur agronomique et une bonne résistance au mildiou. Ces programmes se sont longtemps basés sur l'introduction de résistances spécifiques, à caractère monogénique. Actuellement, onze de ces gènes (R1-R11) ont été identifiés et introduits chez *Solanum tuberosum* à partir de *S. demissum*.

Des gènes similaires ont été également identifiés chez d'autres espèces apparentées à *S. tuberosum*, telles que *S. bulbocastanum*, *S. berthaultii* ou *S. phureja*. Cependant, ces gènes sont très rapidement contournés par les populations parasites et ne peuvent constituer à eux seuls une méthode de lutte durable. Les sélectionneurs s'orientent vers la recherche de résistances polygéniques (Montarry, 2007).

1.4.4 Lutte biologique

La lutte biologique se définit par l'utilisation de micro-organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou les dommages causés par l'organisme pathogène.

Elle consiste à agir sur la régulation des populations de ces organismes nuisibles pour réduire leurs dégâts à un seuil économiquement acceptable, en établissant, au sein de l'agroécosystème, un équilibre biologique stabilisé (Spielman, 1991).

Les micro-organismes pathogènes peuvent être neutralisés par des mécanismes très variés qui aboutissent à leur destruction, ou à leur modification. On appelle ce microorganisme les antagonistes (Davet, 1996). Plusieurs antagonistes peuvent être utilisés dans la lutte biologique. Nous citerons les bactéries du genre *Pseudomonas*, et les champignons du genre *Trichoderma* (Davet, 1996).

Par ailleurs, le comportement de plusieurs espèces de *Phytophthora* est influencé par les micro-organismes du sol induisant soit la stimulation soit l'antagonisme (Malajczuk, 1983). Ainsi, des bactéries antagonistes de *P. infestans* tels que *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Sterptomyces*, pourraient contribuer à limiter l'infection du feuillage ou des tubercules de pomme de terre (Malajczuk, 1983 ; Andrivon, 1994). Selon ces auteurs, les différents mécanismes d'antagonisme évoqués *in vitro* ou dans le sol vis à vis du *P. infestans* sont la fongistase, la lyse structurale du champignon et la production des antibiotiques.

1.5 Généralités sur le genre *Trichoderma*

1.5.1 Historique et taxonomie

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Person (Rifai, 1969; Bisset et *al.*, 1991; Monte et *al.*, 2003 ; Degenkolb et *al.*, 2008). Les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique (Widden et Scottolin, 1988 ; Vining et *al.*, 1990; Fujita et *al.*, 1994; Samuel, 2006).

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma* spp. des agents potentiels en agro-alimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto et *al.*, 1997). Quelques espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et pour leur utilisation comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) (Fujita et *al.*, 1994 ; Schirmböck et *al.*, 1994 ; Roquebert, 1996 ; ; Prieto et *al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek et *al.*, 2003).

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et beaucoup de polémiques. On se base alors, sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que, sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett, 1998).

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma* spp, on se rend compte que leur position taxonomique n'a pas été facile. En 1794, Perso on décrit le premier *Trichoderma* sp. et établit 4 espèces. En 1821, Fries classa les *Trichoderma* sp. parmi les *Gastéromycètes*. En 1860, Tulasne a reconnue l'absence de formes téléomorphes (sexuées) chez ce genre. En 1871, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques (phialides) pour leur identification.

En 1916, Waksman décrit 6 nouvelles souches de *Trichoderma* spp. en utilisant des critères macroscopiques. En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* avec d'autres critères.

En 1939, Bisby propose une unique espèce : *Trichoderma viride*. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma* sp.

En 1963, Gutter et Monbasher ont démontré la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales. En 1969, Rifai propose une classification utilisable avec le concept «d'espèces agrégées», basée sur les caractères microscopiques. Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer. Neuf espèces agrégées ont été décrites (*T. aureoviridae* Rifai., *T. hamatum* Bain., *T.harzianum* Rifai., *T.koningii* Oudemans., *T.longibrachiatum* Rifai., *T.piluliferum* Webster et Rifai., *T.polysporum* Rifai, *T pseudokoningii* Rifai.et *T.viride* Gray.), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai., 1969).

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

En se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Figure. 3) (Leuchtmann, 1996 ; Lieckfeldt et al., 1998 ; Landreau, 2001., Dodd et al. , 2002).

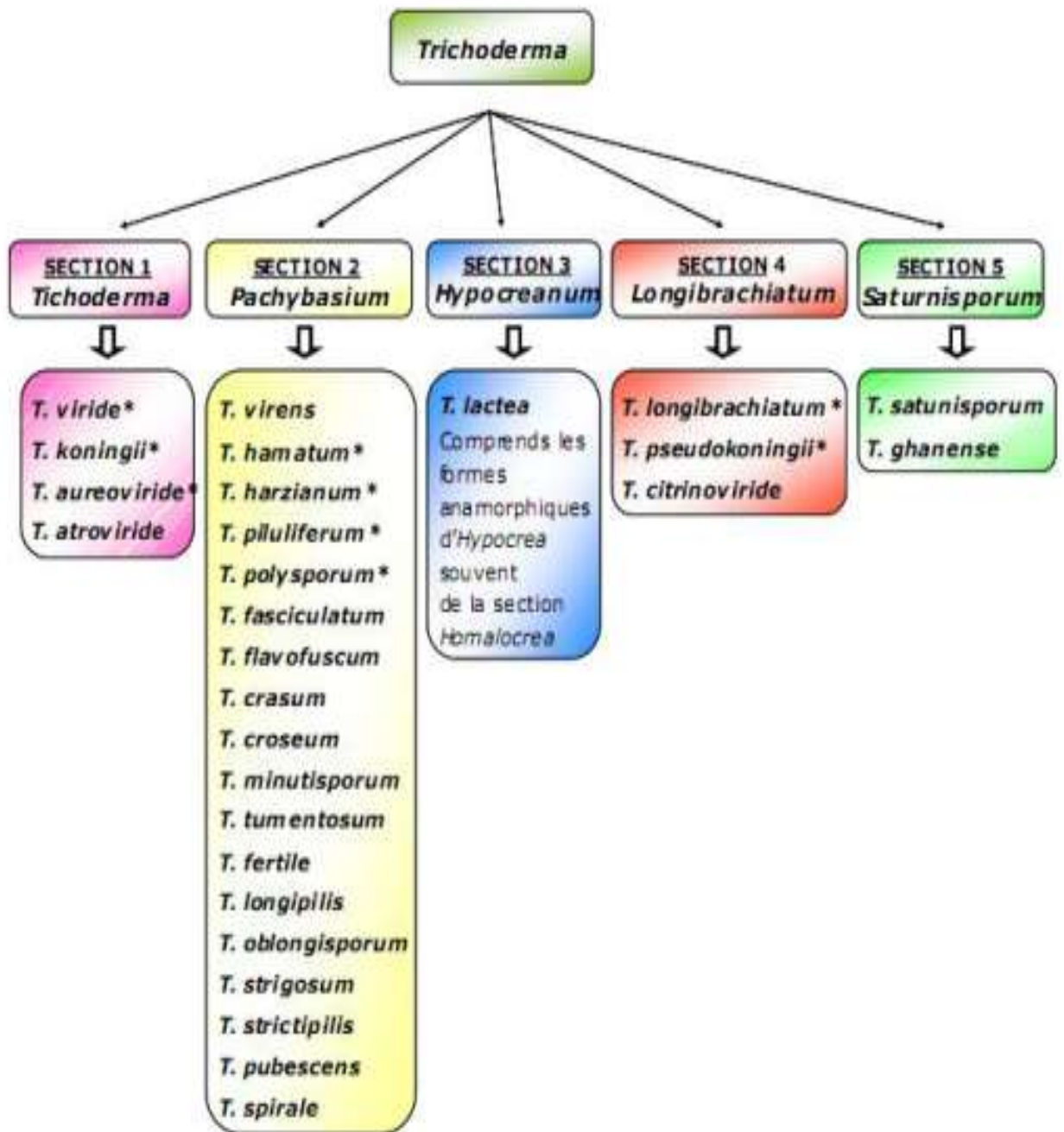


Figure 4 : Sections systématiques de *Trichoderma* spp. et quelques espèces agrégées de Rifai (1969 in Bisset, 1991)

Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement (Lillard-Roberts, 2004).

La méthodologie de cette taxonomie, repose sur des comparaisons de l'aspect morphologique, le profil métabolique, l'examen phylogénétique et la séquence d'ADN avec des bases de données de références internes au laboratoire de Bissett (Canada) (Lillard-Roberts, 2004).

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les Ascomycètes du genre *Hypocrea* (Sugiyama, 1987 ; Kubicek et al.,2003).

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

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

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* est la suivante (Bisset et al.,2004)

Embranchement :	Amastigomycota et/ou Eumycètes
Sous embranchement :	Ascomycotina
Classe :	Sordariomycètes
Ordre :	Hypocréales
Famille :	Hypocraceae
Genre :	<i>Trichoderma</i>

1.5.2 Aspect culturel et Morphologie

Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. La conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse (Mohamed-Benkada, 2006).

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek et al., 2003).

1.5.3 Ecologie

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

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

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

Dans la mer, les *Trichoderma* spp. sont marins facultatifs (Kohlmeyer et al., 1979 ; Liberra et Lindequist, 1995). Ils ont été identifiés à tous les niveaux et isolés à partir d'algues marines (*Rhodophyta* sp. et *Phaeophyta* sp.) prélevées de la côte atlantique et méditerranéenne ibériques (Genilloud et al., 1994) ainsi qu'à partir de moules au Canada (Brewer et al., 1993).

L'abondance des *Trichoderma* spp. dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Widden et Abitrol, 1980 ; Vining, 1990 ; Kubicek et al., 2003).

Les *Trichoderma* spp. Sont des saprophytes omniprésents dans le sol. Ils sporulent abondamment, ont peu de besoins nutritionnels, peuvent croître rapidement et produire des gammes diversifiées de métabolites secondaires, En outre, ils ont la capacité de transformer une variété extrêmement large de matériaux organiques naturels .Ils sont bien connus comme hyper-producteurs d'enzymes de dégradation comme les chitinases et les cellulases. Ils ont été promus indirectement comme agents de lutte biologique et stimulateurs de croissance des plantes (Papavizas,1985;Elad,2000;Dubey et al.,2007;Jayalakshmi et al.,2009).

Les espèces de *Trichoderma* utilisent généralement les sources d'azote à partir de composés d'ammonium et de protéines, l'assimilation du nitrate est rare et dépend de l'espèce (Mahesh et al.,2005).Les substrats carbonés très diversifiés comprennent une large gamme de sucres; certaines espèces peuvent utiliser l'inuline, raffinose, saccharose, acides tannique et gallique (Gond et al.,2007; Olejnikova et al., 2011).

1.5.4 Intérêt de l'utilisation de *Trichoderma* spp. dans l'agriculture biologique

Le *Trichoderma* a été utilisé comme agent de lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes. 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).

Par ailleurs, les travaux de Baker (1988) ont montré que certaines souches de *Trichoderma* semblaient exercer une action stimulatrice sur la croissance de certaines plantes. Dans ce cadre, 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.

Une colonisation importante d'un habitat donné par un organisme dépend essentiellement de sa capacité à défendre ses niches écologiques même s'il y a concurrence pour les nutriments, l'espace et la lumière. De nombreux champignons et particulièrement ceux du genre *Trichoderma* sont spécialisés dans ce domaine (Harman, 2006; Ruocco et al., 2009; Vinale et al.,2009).

La recherche sur les propriétés antagonistes de *Trichoderma* spp. a progressé depuis la découverte en 1932 de *Trichoderma lignorum* (révélé plus tard *T.atroviride*) agissant comme un parasite sur d'autres champignons (Weindling, 1932 in Schuster et Schmoll,2010;

Harman,2011). De nombreuses espèces de *Trichoderma*, principalement *T.harzianum*, *T.virens* et *T.asperellum* sont utilisées dans la lutte biologique contre les champignons pathogènes des plantes tels que *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora* et *Diaporthe*.

1.6 Modes d'action de *Trichoderma* spp

1.6.1 Mycoparasitisme et enzymes lytiques

L'abondance de *Trichoderma* spp. dans les écosystèmes est due à leur production élevée d'enzymes hydrolytiques et leur mycoparasitisme basé sur la sécrétion d'un ensemble complexe d'enzymes dégradant la paroi cellulaire de divers hôtes (Calistru et al.,1997; Eziashi et al., 2006; Reino et al., 2008). Un système multi-enzymatique important a été décrit chez des espèces de *Trichoderma*: les cellulases (Castro et al.,2010) les chitinases (De la Cruz et al.,1992), β -1,3-glucanases (Lorito et al.,1994;Noronha et Ulhoa, 1996 ; Ait-Lahsen et al., 2001) et des protéases (Geremia et al., 1993;Howell, 2003).

Le mécanisme du mycoparasitisme comprend les étapes suivantes :

1.6.1.1 Stimulation

Trichoderma spp. perçoit la présence de son hôte, ses hyphes se dirigent directement vers lui par chimiotropisme. Différentes espèces peuvent suivre différents modèles d'induction, mais en général les champignons produisent des exochitinases à de faibles niveaux dont la diffusion de ces dernières catalyse la libération des oligomères de la paroi fongique du champignon cible, et à leur tour en induisent l'expression des endochitinases qui attaqueront le champignon cible avant le contact (Viterbo et al.,2002; Brunner et al.,2003).

1.6.1.2 Reconnaissance et l'enroulement

L'attachement se fait par la liaison des glucides de la paroi fongique du *Trichoderma* à des lectines sur le champignon cible. Une fois que le *Trichoderma* est attaché, il s'enroule autour de l'agent pathogène et forme des appressoria contenant des concentrations élevées de solutés osmotiques tels que le glycérol (Benitez et al.,2004).

1.6.1.3 Pénétration et la lyse

La production des enzymes lytiques et des peptaïboles permet l'entrée des hyphes de *Trichoderma* dans les hyphes du parasite et facilite ainsi l'assimilation du contenu cellulaire de l'hôte (Howell et al., 2003).

1.6.2 Antibiose et métabolites secondaires

L'antibiose est le processus de sécrétion des composés antimicrobiens par des champignons antagonistes pour lutter contre les agents pathogènes dans leurs zones de croissance (Verma et al.,2007).Les *Trichoderma* spp. produisent des antibiotiques potentiels mais aussi plus de 100 métabolites avec une activité antibiotique, y compris de Polykétides, Pyrones, Terpènes et des Polypeptides utilisés dans la chimio- taxonomie des espèces (Keszler et al.,2000;Degenkolb et al., 2008).

1.6.3 Compétition pour les nutriments et l'espace

La compétition pour le carbone, l'azote et d'autres facteurs de croissance, ainsi que, celle pour l'espace ou les sites spécifiques d'infection, sont utilisées par les agents de lutte biologique, *Trichoderma* spp. ont une forte capacité à utiliser et métaboliser les nutriments du sol, qui le rendent plus compétitives à de nombreux micro-organismes du sol (Benitez et al.,2004). *T.harzianum* est capable de contrôler *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la vigne en colonisant les tissus floraux (Vinale et al.,2008).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*.

1.7 Les métabolites secondaires fongiques

Beaucoup de mycètes et de bactéries peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires (Demain et Fang, 2000). Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui représente une structure chimique unique (Hawksworth et al., 1995; Boiron,

1996). Les métabolites secondaires peuvent avoir des activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressives et toxiques (mycotoxines et phytotoxines) (Jae-Hyuk et Keller, 2005; Keller et Woobok, 2005).

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (Hapwood, 1988 ; Mapleston et *al.*,1992 ; Stone et Williams,1992 ; Demain et Fang, 2000; Calvo et *al.*, 2002). Les métabolites secondaires peuvent avoir les activités suivantes : activent la sporulation (Acide linoléique et ses dérivés produits par *Aspergillus nidulans*) (Champ et *al.*, 1987; Champ et El-zayat, 1989; Calvo et *al.*,2001); Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelles (Kawamura *etal.*,1999);

1.7.1 Production de métabolites utiles par *Trichoderma*

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma* spp. a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et *al.*, 2005).

La littérature ne cite que les métabolites importants de *Trichoderma* spp. qui sont principalement des enzymes et des molécules bioactives. Ghisalbertiet Sivasitham param (1991) ont classé les métabolites secondaires de *Trichoderma* spp. en trois catégories: métabolites volatils, métabolites non volatils diffusibles et les peptaibals.

- Des métabolites volatils comme le 6 pentyl α pyrone, l'éthylène, le cyanure d'hydrogène, les alcools et les aldéhydes (Vizscaino et *al.*, 2005 Stoppacher et *al.*, 2010)
- Des métabolites non volatils diffusibles comme les polyacétates (antifongiques, antibiotiques), les trichotécènes notamment les trichodermines (Blumenthal, 2004 ; Vinale et *al.*,2008) et acide Heptélidique ou Koningique.
- Des métabolites polypeptidiques ; ciclosporines (immunosuppresseurs, anti-inflammatoire) et les peptaïbols (Peptides Acide -Amino Iso Butyrique Amino Alcool) qui sont des oligopeptides linéaires de 12 à 22 acides aminés riches en acide α -aminoisobutyrique, N-acétylés à l'extrémité N- terminale et contenant un amino -alcool à la partie C- terminale, ils sont généralement assimilés à des mycotoxines peptidiques (Landreau., 2001 ; Degenkolb et *al.*, 2003; Wada et Tanaka, 2004; Mohamed-Benkada, 2006; Degenkolb et *al.*, 2008).

En effet, la production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. On cite principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren et *al.*, 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et *al.*, 2003).

MATERIEL
ET
METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

Notre étude comporte quatre parties d'études sur les extraits de filtrats de cultures des isolats d'antagonistes de *Trichoderma* spp. :

- Analyse des extraits de filtrats de cultures des isolats antagonistes par FTIR et par la CG-MS,
- Dosage des polyphénols ,
- Activité antioxydante,
- Activité antifongique *in vitro* et *in vivo* sur *P.infestans* .

2.1 Matériel biologique

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

2.1.1 Matériel fongique

Le matériel fongique est représenté par une collection de 13 isolats antagonistes du genre *Trichoderma* spp provenant de la rhizosphère des zones de production de pomme de terre d'Algérie (Moumene et al.,2012 ;2015) et deux isolats phytopathogène de *Phytophthora infestans* provenant respectivement de la région d'El Abadia de la wilaya de Ain Defla et de Bourkika, wilaya de Tipaza. Ces derniers ont été identifiés comme A1 et A2 par confrontation sexuelle (Moumene, 2015).

2.1.2 Matériel végétal

La semence de pomme de terre de la variété Spunta homologuée, certifiée et largement cultivée a été fournie par le Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants (C.N.C.C) d'EL Harrach. Les tubercules pré germés de cette variété ont été plantés à raison d'un tubercule par pot (10 pots).

2.2 Analyse chimique des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp par FTIR

L'analyse chimique par FRTIR comporte 3 étapes essentielles :

2.2.1 Préparation des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

Des disques de 5mm de chaque isolat de *Trichoderma* spp. sont prélevés à partir de culture âgées de 7jours, puis ensemencés dans des flacons de 500 ml contenant du milieu liquide de Potato-dextrose (annexe 1). et incubés à une température de 30 ± 2 ° C pendant 14jours.

Le filtrat de culture de chaque isolat est récupéré respectivement à travers un papier Watman n° 03. Un volume de chaque filtrat est additionné au butanol . Cette opération est répétée deux fois..Le butanol est évaporé par l'utilisation d'un bain marie réglé à la température de 60°C (Eziashi et *al.*, 2010 ; Mu'ayad Al-Obaidy et *al.*.,2010).

2.2.2 Préparation de l'échantillon en pastille de KBr

Dans un mortier, chaque échantillon est mélangé avec de KBr. Le mélange est déposé dans un moule. Ce dernier est extrait du moule sous la forme d'une pastille. (jean-jacques.auclair.pagesperso-orange.fr/ftirUV/protocole.htm)

Le porte-échantillon contenant la pastille KBr/échantillon est placé dans le compartiment de mesure. Puis le spectre est enregistré suivant les instructions sur l'appareil.

2.2.3 Analyse par FTIR

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) 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.

Pour détecter les groupes fonctionnels des métabolites secondaires, une analyse spectrale FTIR est réalisée à partir des pastilles des filtrats des 13 isolats de *Trichoderma* spp en utilisant le logiciel Opus 6.5 de TENSOR 27 /BOKER.

2.3 Analyse chimique des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp par CG-MS

Cette analyse se déroule selon les deux étapes suivantes :

2.3.1 Préparation des cultures des isolats de *Trichoderma* spp .

Des disques de chaque isolat de *Trichoderma* spp., sont ensemencés dans des flacons de 500 ml contenant du milieu liquide Potato dextrose agar (Annexe n°1) , ces flacons sont incubés dans un incubateur/ agitateur à 120 rpm et à une température de 30 ± 2 ° C pendant 14j. (Shafiquzzaman et *al.*.,2012).

2.3.2 Extraction des métabolites secondaires

Chaque filtrat de culture d'isolat est sujette séparément à une extraction avec 03 solvants organiques, et de polarités croissantes : méthanol, l'hexane et l'acétate d'éthyle à raison de 3 répétitions par solvant.

Les extraits d'acétate d'éthyle ainsi obtenus sont dilués dans de méthanol et de n-hexane suivi d'une évaporation. Tous les solvants sont évaporés à 40°C à l'aide d'un rotavapeur (Shafiquzzaman et *al.*,2012).

2.3.3 Séparation et identification des composés par la CG-MS

2.3.3.1 Séparation des composés des extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

Les 26 extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. obtenus dont 13 extraits à base d'hexane et 13 extraits méthanoliques ont été analysés par la CG-MS en utilisant une colonne capillaire de faible polarité .

2.3.3.2 Identification des composés des extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

L'identification des composés de chaque extrait méthanolique et d'hexane des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. est réalisée à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée de l'appareil GC-MS (Nist et pfelger).

2.4 Dosage des composés phénoliques

Cette étude est réalisée selon les deux étapes suivantes:

2.4.1 Préparation des extraits méthanoliques

Un volume de 2,5 g de de chacun des filtrats des 13 isolats de *Trichoderma* spp est mélangé avec 25ml de méthanol absolu puis soumis à une agitation magnétique pendant 30 minutes. Les extraits sont conservés à la température de 4°C pendant 24 heures, puis filtrés à l'aide d'un papier filtre. Le solvant est évaporé à sec sous pression réduite à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi R- 216 (Falleh et *al.*,2008 ;Bougandoura et *al.*,2012).

2.4.2 Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits est déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu, et *al.*,(1965);Bougandoura et *al.*, (2012).

Une quantité de 200µl d'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de carbonate de sodium (Na₂ CO₃) à 7,5%. Le mélange est incubé à la température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre HACH LANGE/DR6000.

Une courbe d'étalonnage est établie pour la solution d'acide gallique à différentes concentrations. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche.

2.5 Activité antioxydante

L'activité antioxydante est basée sur le test de piégeage du radical libre DPPH . Ce dernier est un radical libre de couleur violette. Il est réduit en un composé jaunâtre en présence de composés anti-radicalaires (Molyneux, 2004).

Le test antioxydant est réalisé avec la méthode au DPPH (Sanchez-Moreno et *al.*, 1998 ,Bougandoura et *al.*, 2012). Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH) qui est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène.

En effet ,50µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (2,4mg/100ml). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite par rapport un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que celles des échantillons. Pour chaque concentration trois répétitions ont été prises en considération. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) .

$$I\% = \left[\frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$$

2.6 Activité antifongique des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. sur *Phytophthora infestans*.

2.6.1 Activité antifongique *in vitro* extraits de filtrats de cultures de *Trichoderma* spp

L'activité antifongique *in vitro* des différents extraits de filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. obtenus a porté sur l'inhibition de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la germination des isolats A1 et A2 de *P. infestans*, où trois répétitions ont été prises en considération.

Ainsi, 2 ml de chaque extrait méthanolique ou /et d'hexane d'isolats de *Trichoderma* spp est versé séparément dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PPA en surfusion .

2.6.1.1 Inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans* .

Un disque de 10 mm de diamètre de chacun des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* est prélevé à partir d'une culture âgée de 7 jours puis déposé au centre des boîtes de Petri contenant le milieu de culture PPA (Annexe 1) en présence de 2ml de chacun d'extraits méthanolique et d'hexane. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 18°C à l'obscurité. 3 répétitions ont été prises en considération.

La croissance mycélienne de chacun des isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans* est évaluée quotidiennement en mesurant le diamètre de la colonie , pendant 7 jours selon la technique de Rapilly (1968).

L'inhibition de la croissance mycélienne est évaluée par le calcul du taux d'inhibition de la croissance mycélienne exprimée en pourcentage selon la formule décrite par Dennis and Webster (1971), Rollan et al. (1999) in Ibarra-Medina and al.(2010):

$$IC (\%) = \frac{(CT - Ct)}{CT} \times 100$$

IC : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%)

CT : Croissance mycélienne de l'agent phytopathogène témoin (mm)

Ct : Croissance mycélienne de l'agent phytopathogène confronté à l'antagoniste (mm).

2.6.1.2 Inhibition de la sporulation et de la germination de *Phytophthora infestans*

Les taux d'inhibition de la sporulation et de la germination des deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans* sont calculés à partir des cultures âgées de 21 jours. Les suspensions sporangiales sont préparées pour chaque isolat, en versant 10 ml d'eau distillée stérile dans chaque culture d'isolat en contact avec l'extrait ainsi que pour le témoin. Ceci en raclant la culture à l'aide d'une pipette pasteur (Hammi A., 2003).

Chaque suspension sporangiale est récupérée dans des tubes à essais stérilisés.

Le nombre de sporanges est déterminé par le biais de la cellule de malassez. Trois répétitions ont été prises en considération pour chaque isolat de *P. infestans* et chaque extrait.

Les taux d'inhibition de la sporulation et de la germination des suspensions sporangiales des deux isolats A1 et A2 soumis aux extraits de filtrats de cultures de *Trichoderma* spp ainsi que celles des isolats témoins ont été déterminés selon les formules décrites par Sy (1976) et Rollan et al. (1999) in Ibarra-Medina et al. (2010) :

$$IS(\%) = \frac{(ST - St)}{ST} \times 100$$

IS : Taux d'inhibition de la sporulation (%)

ST : Nombre de sporanges de l'inoculum témoin/ml)

St : Nombre de sporanges de l'inoculum en contact direct avec les extraits de filtrats de cultures de l'isolat antagoniste/ml.

$$IG(\%) = \frac{(GT - Gt)}{GT} \times 100$$

IG : Taux d'inhibition de la germination (%)

GT : Nombre de sporanges germés de l'inoculum témoin/ml

Gt : Nombre de sporanges germés de l'inoculum en contact direct avec les extraits de filtrat de culture de l'isolat antagoniste/ml

2.6.2 Activité antifongique *in vivo* des extraits de filtrats de culture de *Trichoderma* spp

L'activité antifongique *in vivo* des extraits de filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. a été évaluée sur disques foliaires sains de la variété Spunta de pomme de terre.

Cette technique est réalisée selon les trois étapes suivantes :

2.6.2.1 Préparation du tissu végétal

Les folioles collectées à partir de plants de la variété Spunta de pomme de terre sont soigneusement lavées à l'eau de robinet et découpées en petits disques de 15 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce. Ces derniers sont désinfectés à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 3 minutes puis rincés trois fois à l'eau distillée stérile. Puis placés sur un papier filtre absorbant.

Après séchage, les disques sont déposés dans 4 boîtes (répétitions) en présence du coton imbibé d'eau distillée stérile au fond des boîtes. La face inférieure des disques est placée vers le haut (Klarfeld et al., 2009., Mpika et al. 2009).

2.6.2.2 Inoculation et incubation

Six (06) disques foliaires par boîte ont été inoculés par dépôt de 10 µl de chaque extraits de *Trichoderma* spp suivie de l' inoculation à la face inférieure de chaque disque foliaire par le dépôt de 10µl de suspension sporangiale de 10^5 Sporangies/ml séparément de chacun des isolats A1 et A2 de *P. infestans* .(Mpika et al. 2009).

Le témoin positif est représenté par des boîtes dont les disques foliaires ont été inoculés séparément par les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*.

Les boîtes sont ensuite incubées à 18°C pendant 7jours. Trois répétitions ont été prises en considération.

2.6.2.3 Lecture des résultats

L'activité antifongique des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis des deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans* a été évaluée en notant la présence ou l'absence de symptômes du mildiou développés sur les disques foliaires de pomme de terre.

2.7 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel SYSTAT vers.12, en déterminant la variance par le test ANOVA et à l'aide du GLM (Generalized - Linear Model).

Les résultats de l'activité antifongique *in vitro* des extraits de filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *P.infestans*, le dosage des phénols ainsi que ceux de l'activité antioxydante ont été analysés par le test ANOVA afin de comparer les taux d'inhibition des paramètres enregistrés pour les deux isolats A1 et A2 de *P.infestans*. L'analyse de la variance a été considérée significative lorsque la valeur de P est < 0.05 (Philippeau, 1989).

RESULTATS
ET
DISCUSSION

3. Résultats et Discussion

3.1 Analyse chimique des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. par FTIR.

L'analyse spectrale par FTIR des extraits de filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré la présence de plusieurs pics d'absorption (Annexe n°2), avec la présence de 8 liaisons chimiques correspondant à : C-H, O-H, C=C, C-O, C=O, N-H, C≡N et C-NO₂ sont représentés dans le Tableau 4.

L'analyse chimique par FTIR des extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* sp. a montré 18 groupes chimiques selon les longueurs d'ondes. On distingue par ordre d'importance :

- Les alcanes détectés pour l'ensemble des isolats mis à part l'isolat TB.
- Les acides détectés pour l'ensemble des isolats
- Le groupe aromatique détectés pour l'ensemble des isolats.
- Les hydrocarbures saturés détectés pour l'ensemble des isolats mis à part les isolats TJ ,TE, TH, TL, TM, TB .
- Les alcools et les phénols dont la liaison O-H, détectés pour l'ensemble des isolats
- Les amines détectés pour l'ensemble des isolats mis à part les isolats TJ ,TE,
- Les cétones aromatiques détectés pour les isolats TD, TE, TC, TK et TM
- Les aldéhydes détectés dans les isolats TM, TG, TJ et TF
- Les esters aliphatiques détectés pour l'ensemble des isolats.
- Les alcools primaires détectés pour l'ensemble des isolats mis à part les isolats TJ,TE, TC, TK .
- Les nitriles détectés pour les isolats TH,TC, TK et TI .
- Les Groupement nitro (aliphatiques), détectés pour les isolats TI TM et TG ;
- Les Alcène aromatiques détectés pour les isolats TD ,TA, TF
- Les Alcools secondaires détectés seulement pour les isolats TC,TF
- Les éthers dont la fonction est détectés seulement pour les isolats .
- Les groupement aromatique détectés seulement pour l'isolat TK
- Les acides détectés seulement pour l'isolat TB.
- Les esters détectés seulement pour l'isolat TK.

Les aldéhydes aromatiques détectés seulement pour l'isolat TC

Ainsi, l'analyse chimique des extraits des filtrats de cultures par FTIR a mis en évidence une variabilité entre les différents isolats d'antagonistes en se basant sur les groupes chimiques identifiés selon les longueurs d'ondes.

Les résultats obtenus concordent avec ceux de nombreux travaux rapportés par la bibliographie on cite Mu'ayad *et al.*(2010) qui ont montré la présence d'un cycle aromatique chez les filtrats de cultures des deux espèces :*T.harzianum et T.viride* par analyse chimique FTIR .

Notre étude a mis en évidence la présence des cycles aromatiques (aldéhydes aromatiques, Groupements aromatiques, cétones aromatiques) dans les filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. cités ci-dessous.

Les travaux de Saran sundar *et al.* (2013) ont montré par l'analyse spectrale par FTIR des métabolites secondaires de *Trichoderma* spp pour les longueurs d'ondes 3780.60 et 3404.47 attribués au groupe OH et pour les longueurs d'ondes 1735.99 et 1076.32 aux groupes C=O et C-C. Notre étude a affirmé la liaison chimique OH détectée aux longueurs d'ondes comprises entre 3400 et 3200 et la liaison chimique C=O détectée aux longueurs d'ondes comprises entre 1750-1730.

Siktusnadi *et al.* (2000) ont prouvé dans les spectres FTIR de *T. Harzianum* la présence de groupes fonctionnels OH, CH, C = O et NH₂, ces liaisons chimiques ont été enregistrées dans nos extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

3.2 Analyse chimique des extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.par CG-SM

32 métabolites fongiques ont été identifiés dans les extraits des 13 isolats de *Trichoderma* spp. par l'analyse de chromatogramme de CG-SM. Ces métabolites sont obtenus à différents temps de rétention. Rappelons que plusieurs pics n'ont pas été identifiés (Annexe n°3 et 4).

3.2.1 Composés identifiés à partir des extraits methanolique des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.par CG-SM

23 composés ont été identifiés à partir des extraits methanoliques (Tableau 5).Le composé 6-pentyle-alpha-pyrone (6-PP) a été présent dans tous les extraits methonoliques au temps de rétention de 7.02min (Annexe n°3).

Ainsi ce composé reste majoritaire dans les 13 extraits suivi d'Hexadecanoic acid Methyl Ester présent dans les 12 extraits à l'exception de l'extrait de l'isolat TL. Le Methylstearate a été détecté seulement dans 9 extraits des isolats de *Trichoderma* spp. : TA,TB ,TC,TD,TE,TF,TI,TJ et TK. Aussi, l'Octadecenoic acid ethyl ester n'était présent que dans les extraits des isolats de *Trichoderma* spp : TD ,TF,TK ainsi que l'Hexadecanoic acid ethyl ester détecté uniquement dans 4 extraits des isolats de *Trichoderma* spp. :TB,TF,TI et TK.

Par ailleurs, d'autres composés tels que l'Hexanoic acid,3-(2,2,3,3-Tetramethyl cyclopropylidomethylidene) ont été identifiés seulement dans un extrait. Le 5-actoxymethyl-2,6,10-trimethyl-2,9-undecadien-6-ol a été présent dans l'extrait de l'isolat de trichoderma spp.

Les deux composés : acide Linoléique ethyl ester et acid,15methyl-,methyl ester ont été détectés seulement dans un seul extrait. Par contre, les composés :Tridecanoic acid,methyl ester ,at été présents dans l'extrait de l'isolat TK.

Les quatre composés : L'Octacosane, , le Hexacosane et le Tetracosane ont été détectés seulement dans l'extrait de l'isolat TH.

Aussi, le Benzoic acid,2,6 Bis[(Trimethylsilyl)oxy]-,Trimethyl,le Benzenactetric acid,2,5-Bis[(Trimethylsilyl)oxy], Trimethylsilyl , le 1-Hexadecanol ,le 8,11-Eicosadienoic acid methyl ester et le 10-Octadecenoic acid methyl ester ont été recensés que dans l'extrait de l'isolat TD.

3.2.2 Analyse chimique des extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. par CG-SM.

13 composés ont été identifiés à partir des extraits d'hexane de filtrats de cultures de 13 isolats de *Trichoderma* spp. (Tableau 6).

En effet, le composé chimique le 6PP est le plus dominant ,détecté au niveau des 13 extraits suivi de l'Hexadecanoic acid ethyl ester qui n'était présent que dans 4 extraits des isolats de TF,TH,TM et TK .Par contre , le Heneicosane n'était détecté que dans les extraits des isolats TG,TB et TD. Aussi, l'Octadecanoic acid ethyl ester et le Heneicosane sont présents respectivement dans les extraits des isolats de TF, TK et TB, TD.

Pour les extraits d'hexane des filtrats de cultures de quatre isolats TA,TJ, TC et TE un seul composé a été identifié il s'agit du 6PP (6-pentyl -2H-pyran-2-one).

Alors que ,le Tetrateracotane n'a été mis en évidence que dans l'extrait d'isolat TD.

3.2.3 Les composés identifiés dans les deux extraits méthanoliques et d'hexane

trois composés chimiques, le 6PP, l'hexadecanoic acid ethyl ester et le 5-Acetoxymethyl-2,6,10-trimethyl-2,9-undecadien-6-ol ont été identifiés dans les deux types d'extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.

Une analyse factorielle des composés (AFC) a été effectuée sur les métabolites identifiés à partir des deux types d'extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. L'étude des corrélations a été réalisée sur deux axes (Figure 5). L'axe1 représenté par la catégorie de données présentant une contribution de 24.00% pour les extraits méthanoliques et 27,33 pour les extraits d'hexane et l'axe 2 représenté par les données d'une contribution de 21% pour les deux types d'extraits. Les calculs de la distance euclidienne ont montré la présence de 4 groupes pour les extraits méthanoliques et 3 groupes pour les extraits d'hexane. Chaque groupe renferme les isolats de *Trichoderma* spp et les composés chimiques.

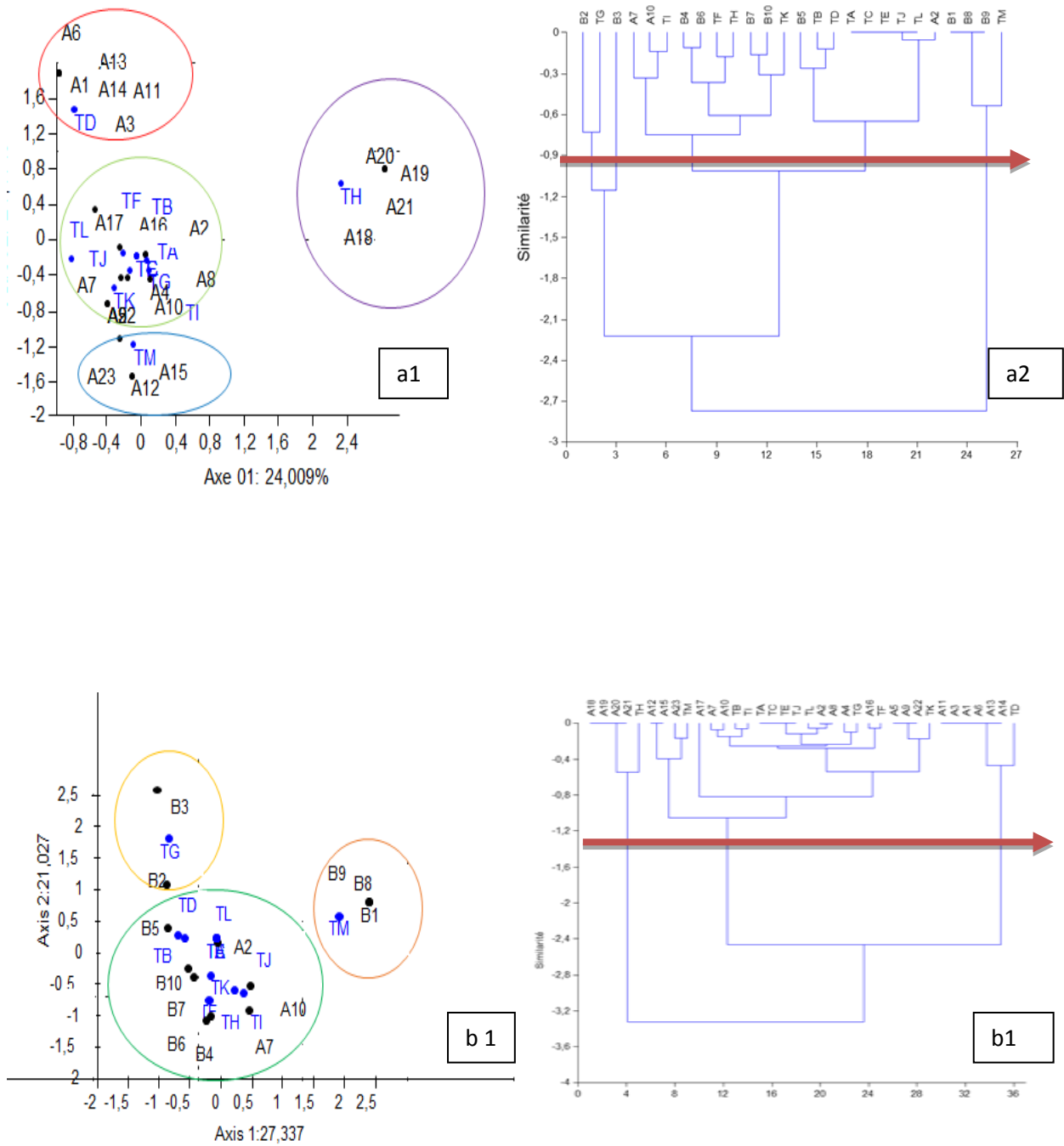


Figure 5 : Analyse factorielle des composés (AFC)

a : Selon les extraits méthanoliques de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

b : Selon les extraits d'hexanes de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

par Eman R et *al.*, 2015 à partir des filtrats de culture de *Trichoderma asperellum*.

Les résultats obtenus par Hamed .E et *al.*, 2015.ont prouvé la présence de 24 composés à savoir : 1,7-Octadiyne 2Phenol-3,4,5-tri- methoxy ,Methyl–furancarbox- Aldehyde, 2-Ethylacridine , β -Fenchol ,Terpinene-1, Phenol-2,4-dioctyl , Tetradecane , 9- Pentadecane ,10- 1-hexadecene, Hexadecane , Benzene(1-butyl-heptyl), Pentatriacontene ,Octadecan-3-ethyl-5(2ethylbutyl),Benzene (1-butyl- Nonyl Phthalic acid butyl isohexyl ester,Nonadecane ,Benzene (1-methyl- dodecyl) ,Hexadecanoic acid methyl ester, Hexadecanoic acid ethyl ester, Heptadecanoic acid ethyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid (z,z) methyl ester ,Phthalic acid-iso Hexylisopropyl ester et Phthalic acid dibutyl ester.

Par ailleurs, Darmayasa. B.G et *al.* (2014) ,ont identifiés après analyse par CG-MS des filtrats de cultures de *Trichoderma asperellum* la présence de huit métabolites secondaires : 2,2,4,4 - Tetramethyl ; 1 - Tetradecene ; Phenol , 2,4 - bis (1,1 -dimethylethyl- (CAS) 2,4 ; 1-Hexadecane (CAS) Cetene ; 1 - Octadecene (CAS), alpha – Octadecene et hexadecanoic acid methyl ester (CAS) Methyl et n - Tetracosano - 1. dont , 3 métabolites ont été cités dans notre étude ,pour les extraits de filtrats de culture des 13 isolats de *Trichoderma* spp.

Shafiquzzaman et *al.*(2012) ont également identifié plus de 278 métabolites fongiques, à partir des filtrats de culture de *T. harzianum*, en utilisant trois colonnes capillaires où plusieurs de ces composés n'ont pas été identifiés auparavant. En effet, 07 métabolites ont été identifiés dans notre étude à partir des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp.à savoir : le 6PP (6-n-pentyl-6H-pyranne-2-one),l' Hexadecanoic acid ,l'Eicosane ,l'Octadecanoic acid methyl ester ,le 1-hexadecanol,l'Octacosane,le Tetratetracontane.

Aussi , le 6PP est le composé volatile le plus fréquemment identifié. Par ailleurs, Sivasithamparam et Ghisalberti (1998) ont rapporté que les espèces de *Trichoderma* sont connues par la production de plus de 40 métabolites à effet mycoparasitaires et antibiotiques.

De même ,les composés : 3 – Ethyl – 3 Methylheptane, Undecane, Heptadecane, 9 –hexyl, Octadecane, 3 – Ethyl – 5 – (2- ethylbutyl) et Tetratetracontane ont été identifiés à partir des extraits méthanoliques des filtrats de cultures de *Trichoderma virens* par l'analyse chimique la GC-MS (Ramasamy.M et *al.*,2013). Les deux composés l'Octadecane et le Tetratetracontane ont été également identifiés à partir des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

Granica-Vegara et *al.* (2015) ont prouvé que le 6-pentyl -2H- pyran- 2-one (6PP) est le composé majeur synthétisé par les espèces de *Trichoderma* spp. Aussi, Scartelletti et *al.*(1994),Worasatit et *al.*(1994) ont montré que *Trichoderma viride*,*T.harzianum* et

T.koningii ont un pouvoir producteur du composé 6PP ayant un rôle important dans la lutte biologique vis-à-vis de plusieurs agents phytopathogènes.

Ceux-ci concordent avec les résultats de Dubey et al. (2011) qui ont mentionné la présence d'une large gamme de métabolites secondaires dans les filtrats de cultures de *T. harzianum*, *T. viride* et *T. virens* agents responsables de la lutte biologique contre *Rhizoctonia solani* ainsi que *Trichoderma atroviride* agent de biocontrôle de *Phomopsis* sp.

Ghisalberti et Sivasithamparam (1991), ont souligné également que la diversité des métabolites secondaires produits par *Trichoderma* est liée à la souche de *Trichoderma*. Ce qui explique la variabilité des composés chimiques identifiés dans nos extraits méthanoliques et d'hexanes des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp.

Des travaux similaires ont prouvé également, que les composés volatils : β - Phelandrene, 6-pentyl-2H-pyran-2-one produits par *T. atroviride* OY 3807 ont été estimés à 85% par rapport à l'ensemble des métabolites volatils produits. Ce sont donc les composés antifongiques actifs potentiellement produits par *T.atroviride* .

Ce même composé (6- pentyl-alpha-pyrone) a été le plus représentatif des 11 métabolites volatils identifiés à partir de *Trichoderma atroviride* (Stoppacher et al.2014).

Par ailleurs, Collins et Halim 1972 ont identifié le composé le 6PP comme l'un des principaux composés bioactifs de plusieurs isolats de *T. harzianum* et *T. koningii*.

Des travaux similaires ont également cité que ce composé est responsable de la réduction des mycotoxines tel que le déoxynivalénol produits par *Fusarium graminearum* (Cooney et al.,2001) et la réduction de la croissance mycélienne de *Rhizoctonia solani* et *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Scarselletti et al.,1994).

Andriamialisoa et al.(2004) ont extrait ce dernier à partir des filtrats de cultures de plusieurs espèces de *Trichoderma* spp. utilisé comme agent de lutte biologique vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes.

El-Hasan et al.,(2008) ont démontré que ce même composé majoritaire synthétisé par *T. harzianum* dégrade l'acide fusarique (FA) ,les mycotoxines et inhibe la croissance mycélienne de *F. moniliforme*.

Il est important de résumer les résultats les plus importants suivants :

- L'existence de plusieurs composés dans les 13 extraits de filtrats de cultures analysés par la CG-MS appartenant aux différents groupes chimiques.
- Le composé 6 PP a été identifié dans les deux types d'extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures de tous les isolats de *Trichoderma* spp testés.
- Une variabilité des composés identifiés a été révélée entre les 13 isolats de *Trichoderma* spp.
- Tous les composés détectés dans les extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp par la CG-MS appartiennent aux groupes chimiques identifiés par l'analyse FTIR à savoir les : alcanes, alcools, cétones, pyrones, acides, esters et les alcènes. Ainsi, les résultats obtenus par la CG-MS confirment ceux mis en évidence par l'analyse FTIR.

3.3. Activité antioxydante des extraits de filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp.

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. et l'antioxydant standard : l'acide ascorbique est déterminée par un spectrophotomètre UV visible, suivant la réduction du radical DPPH (passage de la couleur violette (DPPH) à la couleur jaune (DPPH-H), l'absorbance est mesurée à 515 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité anti-radicalaire. Ces résultats révèlent que tous les extraits ont un effet antioxydant.

L'analyse de variance de l'activité antioxydante a montré une différence hautement significative selon les extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. (Annexe n° 5). et l'antioxydant standard d'acide ascorbique (Figure 6).

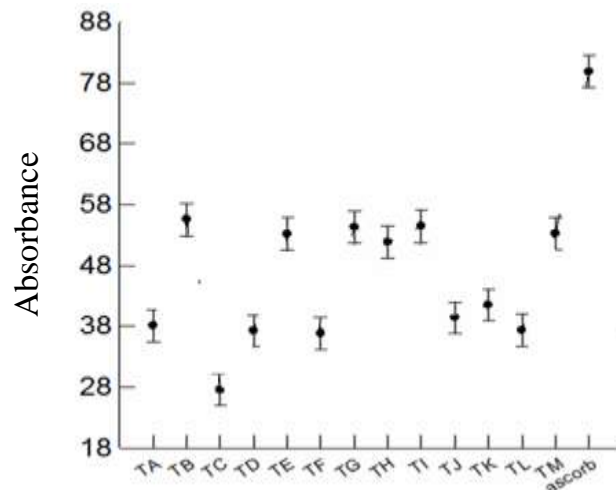


Figure 6 : Activité antioxydante des extraits des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. selon le modèle GLM .

Selon le modèle GLM, l'extrait méthanolique de l'isolat TB a présenté l'activité antiradicalaire la plus élevée à différentes concentrations (56.13 %) suivi par l'extrait des isolats : TI, TG, TE, TM et TH avec une activité respectivement de 53.93 % , 53.83 % , 53.09 % , 51.94 % , 51.68 % . La plus faible activité antioxydante a été enregistrée par l'extrait méthanolique de l'isolat TD avec un taux d'inhibition de 36.62 % .D'autre taux variant de 37 à 39,76 % ont été enregistrés pour les extraits des isolats : TL, TK, TJ, TC, TF et TA.

Cependant, le témoin positif correspondant à l'acide ascorbique a montré une activité antiradicalaire plus importante (78.79 %).

Aussi, l'ensemble des extraits des isolats de *Trichoderma* spp. ont montré un pouvoir réducteur moyen, mis à part celui de l'isolat TD.

3.4. Dosage des Phénols totaux des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

Le dosage des composés phénoliques est effectué en fonction d'une courbe d'étalonnage à partir d'une solution étalon d'acide gallique à différentes concentrations (Annexe n°5).

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 7).

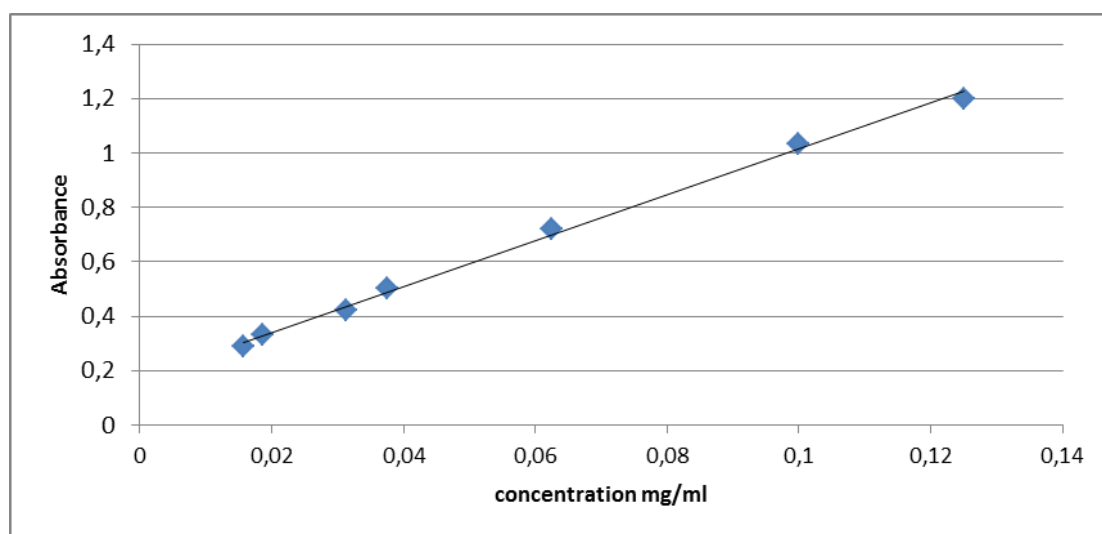


Figure 6 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

L'analyse de variance des taux de polyphénols a montré une différence significative selon les différents extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp (Annexe n°5).

En modèle GLM, le taux des composés phénoliques le plus élevé a été enregistré dans l'extrait de filtrat de culture de l'isolat TD avec une concentration de 0.0369 mg/ml, suivi de celui de l'isolat TE avec la concentration de 0.0255 mg/ml (Figure 8).

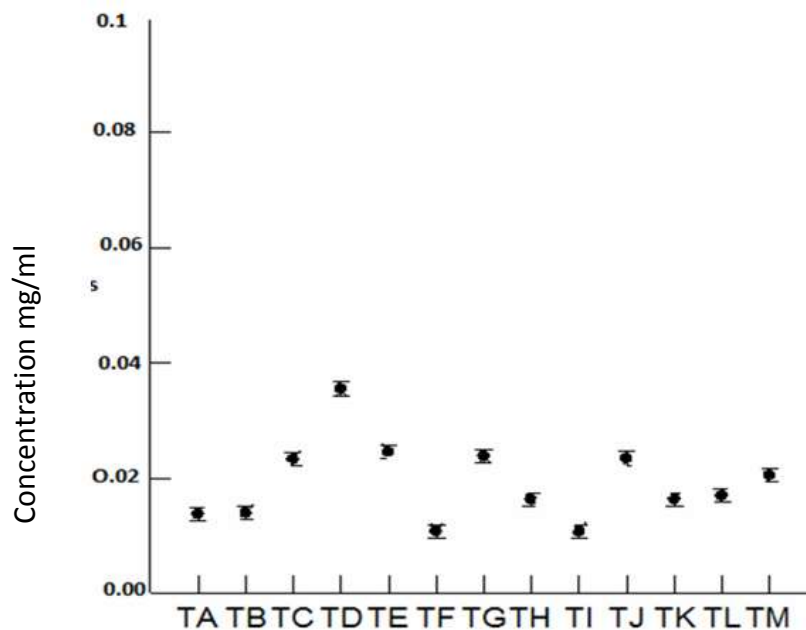


Figure 8 : Taux des phénols totaux des extraits des filtrats de cultures *Trichoderma* spp. selon le modèle GLM

3.5. Activité antagoniste *in vitro* des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

3.5.1. Inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthora infestans*

Les deux isolats A1 et A2 de *Phytophthora infestans* mis en contact direct avec les extraits d'hexane et méthanoliques des 13 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré une réduction importante de leur croissance mycélienne. C'est au cours du 4^{ème} jour d'incubation que la croissance mycélienne de l'isolat A1 était apparente dans les boîtes de pétri contenant les extraits méthanoliques des filtrats de culture des isolats antagonistes TF, TM, TH, TL et TM. Les colonies ont présenté un diamètre compris entre 10,66 à 12 mm. En ce qui concerne, la croissance mycélienne de l'isolat A2, le diamètre des colonies était compris entre 10,66 et 13,66 mm pour les extraits des filtrats de culture des isolats antagonistes TB, TL, TJ, TM, TA, TD, TF et TI.

Par ailleurs, les extraits d'hexane des isolats TA, TG, TI, TL et TM ainsi que, les extraits méthanoliques des isolats TA, TB, TC, TD, TE, TG, TI, TJ et TK ont complètement inhibé

la croissance mycélienne de l'isolat A1 (Figures 8). De même, l'extrait d'hexane des filtrats de cultures de l'isolat TA et les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats TC, TE, TG ,TH et TA ont inhibé la croissance mycélienne de l'isolat A2 (Figure 9).

L'analyse de variance de l'effet des différents extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. a montré une différence hautement significative selon les extraits des filtrats de cultures, les isolats de *P.infestans* et l'interaction isolats de *P.infestans* et les filtrats de cultures 13 isolats de *Trichoderma* spp. (Annexe n° 6).

Une variabilité du pouvoir inhibiteur des extraits de filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp selon les deux isolats A1 et A2 de *P.infestans* a été enregistrée en modèle GLM .

Les extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats : TA, TG, TI,TL et TM ainsi que , les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats : TA, TB, TC, TD, TE, TG ,TI, TJ et TK ont montré une inhibition complète de la croissance mycélienne de l'isolat A1 (Figure 10). Pour l'isolat A2, l'extrait d'hexane du filtrat de culture de l'isolat TA et les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats : TC, TE, TG, TH et TK ont enregistré une inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat A2 (Figure 10).

D'autres taux d'inhibition variant de 93 à plus de 99% ont été enregistrés pour la croissance mycélienne avec les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats : TF, TH, TL, TM ainsi que, les extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats : TD, TC, TJ, TH, TF, TK, TB, TE vis-à-vis de l'isolat A1 de *P.infestans* (Figure 10).

Des taux d'inhibition importants compris entre plus de 86 % à plus de 99% ont été enregistrés pour les extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats TD, TI, TB, TG, TH, TJ, TE, TF, TC, TL, TM et TK et les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats TB, TL, TJ, TA, TM, TD, TF et TI pour l'isolat A2 de *P.infestans* (Figure 10)

Figure 9 : Pouvoir inhibiteur de quelques extraits méthanolique et d'hexane des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. sur *P.infestans*

a : Selon les extraits méthanolique vis-à-vis des isolats de *P.infestans* (a1/A2, a2/A1)

b : Selon les extraits d'hexane vis-à-vis des isolats de *P.infestans* (b1/A2, b2/A1)

c : Témoin positif isolat A2

d : Témoin positif isolat A1

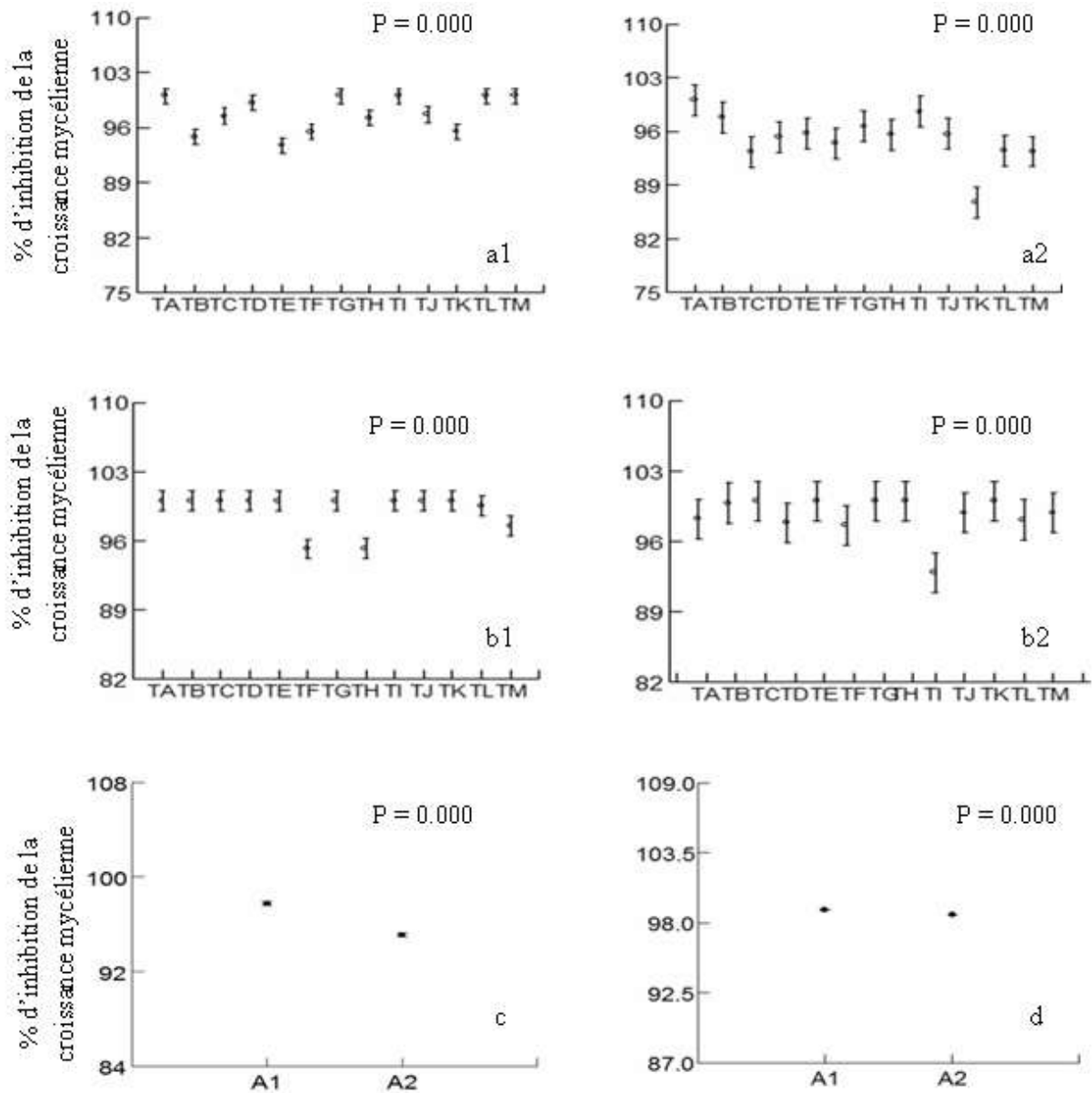


Figure 10 : Analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des deux types sexuels de *P.infestans* sous l'effet des extraits des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. en model GLM.

a : selon les extraits d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. (a1/A1, a2/A2)

b : selon les extraits methanoliques des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.(b1/A1, b2/A2)

c : selon les isolats A1 et A2 vis-à-vis des extraits d'hexane des filtrats decultures de *Trichoderma* spp.

d : Selon les isolats A1 et A2 vis-à-vis des extraits methanoliques desfiltrats de cultures de *Trichoderma* spp.

3.5.2. Inhibition de la sporulation et de la germination de *Phytophthora infestans*

L'analyse de la variance des taux d'inhibition de la sporulation et de la germination des deux isolats A1 et A2 de *P.infestans* mis en contact avec chacun des extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. a montré une différence très hautement significative selon les extraits des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp., les types sexuels de *P.infestans* et l'interaction isolats de *P.infestans* et les filtrats de cultures 13 isolats de *Trichoderma* spp. (Annexe n°6).

Une inhibition complète a été enregistrée pour les extraits méthanoliques des 13 isolats *Trichoderma* spp. ainsi que, pour les extraits d'hexane des isolats : TA, TG, TL, TM, TI vis-à-vis de l'isolat A1 de *P.infestans* (Figure 11). De même, des taux d'inhibition importants variant de plus de 94% à plus de 99% ont été enregistrés pour les extraits d'hexane des isolats antagonistes : TB, TC ,TD ,TE, TF, TH, TJ, TK vis-à-vis de l'isolat A1 de *P.infestans* .Pour l'isolat A2, une inhibition complète de la sporulation et de la germination a été enregistrée pour les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats TE,TC ,TH, TG,TK TM et l'extrait d'hexane de filtrat de culture de l'isolat TH .D'importants taux d'inhibition de 90% à 98 % ont été enregistrés également sur la sporulation pour les extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp.

Pour la germination, des taux supérieurs à 93% et avoisinant 100 % (l'isolat TH) ont été enregistrés pour les extraits d'hexane des filtrats de cultures de 12 isolats de *Trichoderma* spp.(Figure 12). Les résultats obtenus ont prouvé que l'isolat A1 est plus inhibé par les extraits des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. (Figure 12).

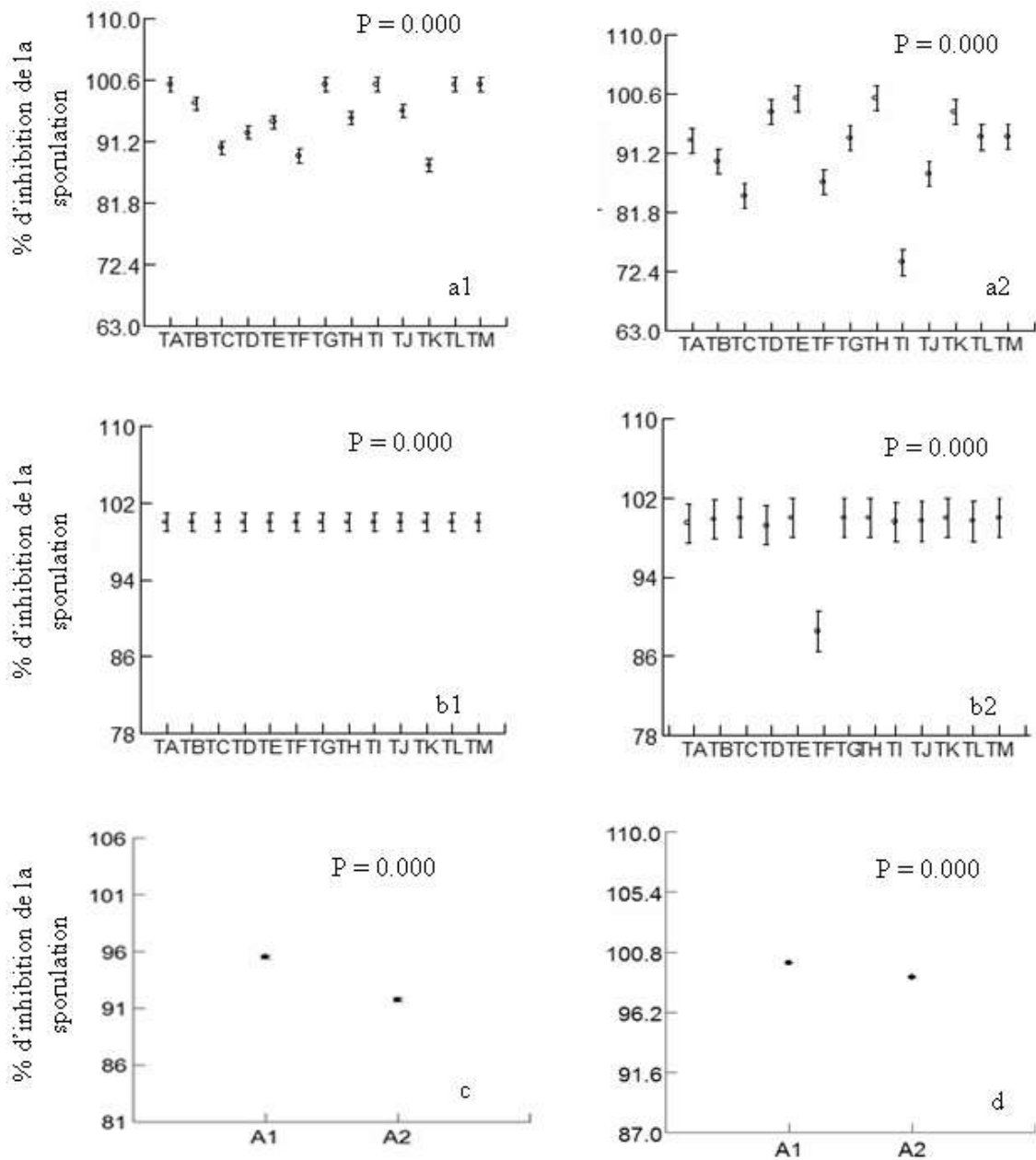


Figure 11 : Analyse de la variance selon le modèle GLM de l'effet des extraits methanoliques et d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. sur la sporulation de *P. infestans*.

a : Selon les extraits d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* sp. (a1/A1, a2/A2).

b : Selon les extraits methanoliques des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. (b1/A1, b2/A2).

c : Selon les es isolats A1 et A2 vis-à-vis des extraits d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.

d : Selon les isolats A1 et A2 vis-à-vis des extraits methanoliques des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.

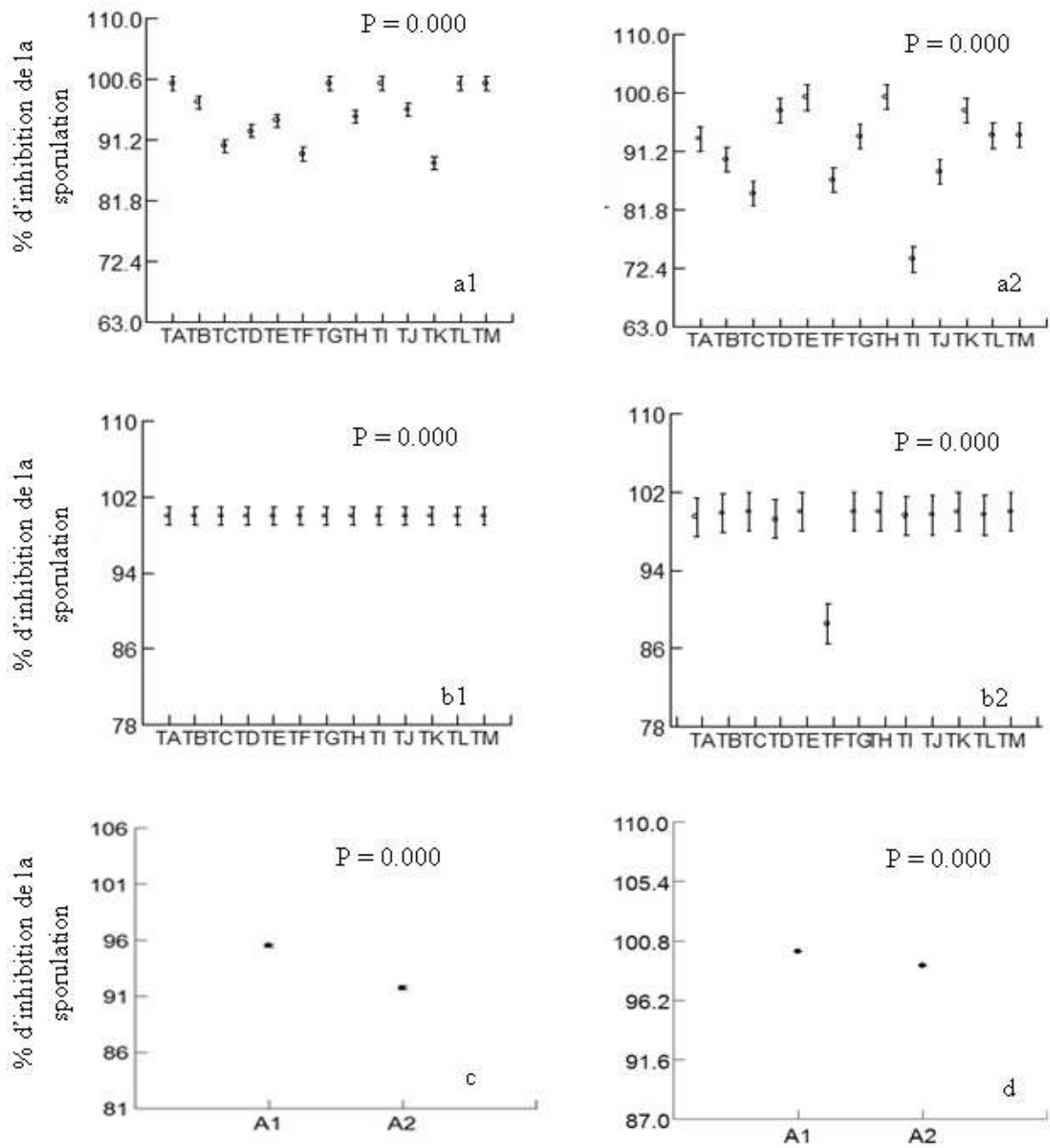


Figure 12 : Analyse de la variance selon le modèle GLM de l'effet des extraits d'hexanes filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. sur la germination de *P. infestans*

a : Selon les extraits d'hexane des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.(a1/A1,a2/A2).

b : Selon les extraits methanoliques des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.(b1/A1,b2/A2).

c : Selon les isolats A1 et A2 vis-à-vis des extraits d'hexane des filtrats de culturesde *Trichoderma* spp.

d : Selon les isolats A1 et A2 vis-à-vis des extraits xtrraits methanoliques des filtrats de cultures de *Trichoderm* spp.

filtrats de cultures des isolats antagonistes : TC ,TE, TG ,TK ont été sélectionnés en vue de leur utilisation pour la réduction des deux isolats pathogènes A1 et A2 de *P. infestans* (Figure 13).

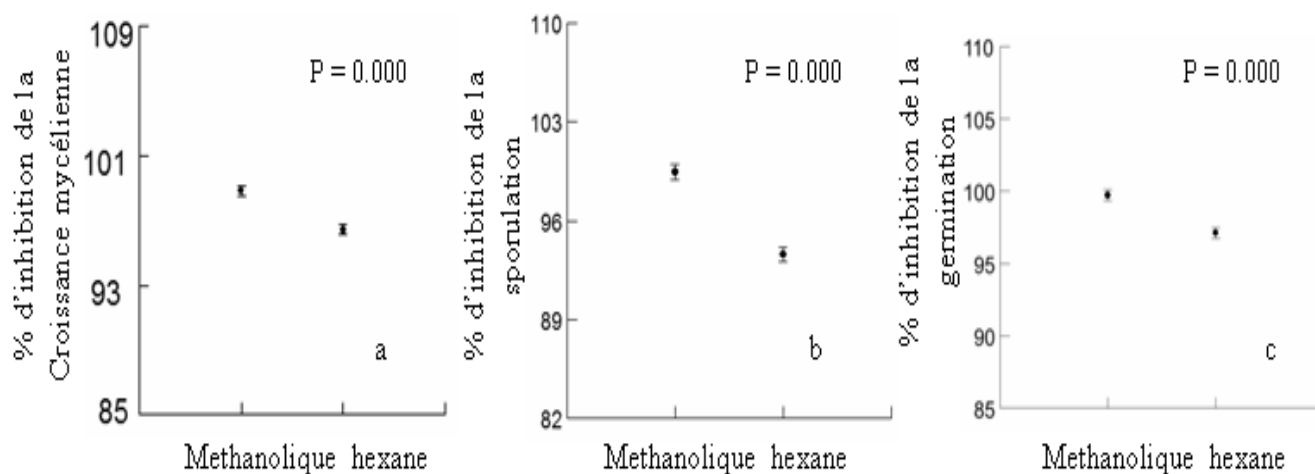


Figure 13 : Analyse de la variance des taux d'inhibition de la croissance mycelienne(a), la sporulation (b) et la germination (c) de *P. infestans* en modèle GLM selon les types d'extraits.

En résumé, tous les extraits méthanoliques et d'hexanes de filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré une réduction importante de la croissance mycélienne, de la sporulation et de la germination avec des taux d'inhibition variant de 86% à 100% vis-à-vis des deux isolats A1 et A2 de *P.infestans*.

Des inhibitions complètes ont été enregistrées sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination vis-à-vis de l'isolat A1 par les extraits d'hexane des filtrats de cultures des isolats TA, TG, TI, TL et TM. Il est de même pour les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats TA, TB, TC, TD, TE, TG, TI, TJ et TK. Par contre la sporulation de l'isolat A1 a été inhibée complètement par l'ensemble des isolats *Trichoderma* spp.

Alors que celle l'isolat A2 n'a été inhibée que par les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats : TC, TE, TG, TH et TK ainsi que, l'extrait d'hexane de filtrat de culture de l'isolat TA.

Les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats antagonistes : TC, TE, TG et TK ont montré une inhibition complète de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des isolats A1 et A2 de *P. infestans* ce qui peut expliquer l'effet inhibiteur important du composé 6PP présent chez les isolats : TC, TE, TG et TK.

Les résultats obtenus ont montré que l'isolat A1 était plus inhibé par les deux types d'extraits de filtrats de cultures de *Trichoderma* spp.

La variabilité de l'activité antagoniste des extraits de filtrats de cultures des antagonistes du genre *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *P. infestans* réside dans leur composition chimique préalablement confirmée par l'analyse chimique la GC-MS dont, le 6PP qui était le composé présent dans tous filtrats de cultures de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp.

Les extraits précédemment cités ont confirmé une importante activité antifongique et ont montré une activité antioxydante comprise entre 51.68% et 56.13% .

3.5.3. Evènements mycoparasitaires des extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp.

Des observations microscopiques de la morphologie des isolats A1 et A2 de *P.infestans* sous l'effet des extraits des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp ont révélé une modification importante du mycélium : comme la vacuolisation, l'enroulement, ainsi que la déformation et l'éclatement des sporanges des deux isolats A1 et A2 de *P.infestans* (Figure 14).

Figure 14 : Modification morphologique des isolats de *P.infestans* sous l'effet des Extraits methalonique et d'Hexane.

a : Vacualisation du mycelium

b : Enroulement du mycelium

c : Début d'éclatement des sporanges

d : Eclatement du sporange

e : Déformation des sporanges

e,f : Temoin positif sporange et mycelium de *P.infestans*

ont souligné l'absence de germination de spores sous l'effet des filtrats de cultures de *Trichoderma virens*, *T. viride* et *Pseudomonas fluorescens* avec *Phytophthora infestans*, après 48 heures d'incubation.

Kerroum et al. (2015) ont montré que les souches antagonistes de *Trichoderma harzianum* étaient capables de réduire la croissance mycélienne de *P. infestans* ainsi que, l'incidence de la maladie .Plusieurs travaux dans ce sens ont traduit ces résultats par la sécrétion différentielle de substances antifongiques comme les métabolites toxiques et les antibiotiques pouvant induire la lyse du mycélium des champignons pathogènes (Dennis et Webster, 1971; Claydon et al. 1987, Lorito et al., 1994) et des enzymes (Lorito et al.,1993)

El-Hasan et al., (2009) ont prouvé que la production de viridiofungine A (VFA) dans le filtrat de culture de l'isolat T23 de *T. harzianum* a inhibé la germination des sporanges de *Phytophthora infestans*. Chambre et Scott (1995) ont affirmé que les filtrats de cultures de *Trichoderma hamatum* et *Gliocladium virens* inhibent la croissance de *Phytophthora cinnamomi* et *Phytophthora citricola*.

Tarus et al. (2003) ont souligné que le composé n-pentyle pyrone contenu dans les extraits des filtrats de cultures des espèces de *Trichoderma* représente le métabolite le potentiel inhibiteur de la croissance de *Armillaria mellea*.

D'autres études ont souligné que les composés volatils produits par les isolats *T. harzianum* T23 et T16 ont des effets inhibiteurs sur la croissance mycélienne de *Fusarium moniliforme*. Cette dernière a été sensiblement retardée par les isolats précédemment cités avec des taux de 51 et 43%. Dans le même sens, le composé 6PP a également inhibé la production de conidies et la germination de *F. moniliforme* (El-Hasan et al., 2007).

Guoliang Yin et al., (2010) ont montré que les extraits d'acétate d'éthyle des filtrats de cultures de *Trichoderma* spp. à différentes concentrations avait un effet inhibiteur important sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des conidies de *Botrytis cinerea*.

Des études similaires ont révélé aussi, que les métabolites produits par *Trichoderma* spp. étaient efficaces contre une large gamme de champignons phytopathogènes comme *Fusarium solani* (74,4%), *Alternaria solani* (70,0%), *Pythium aphanidermatum* (67,7%) et *Macrophomina phaseolina* (50,0%) (Svetlana et al., 2010).

Benhamou et al. (1990) ont signalé l'induction d'altération avec une perte cytoplasmique chez *Fusarium oxysporum fsp radicislycopersici* suite, à l'action de *Trichoderma harzianum* malgré, l'absence du contact direct entre les deux champignons.

Les filtrats de cultures des deux antagonistes : *T. viride* et *Gliocladium virens* ont considérablement inhibé la croissance de *Rhizoctonia solani*, en augmentant la concentration des filtrats dans les milieux de culture (Haikal, 2008).

Des extraits de filtrats de cultures de *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*, *Paecilomyces lilacinus* et *Pseudomonas fluorescens* testés *in vitro* sur *Phytophthora infestans*, ont montré une inhibition complète de la sporulation et de la germination des sporanges de *P. infestans* (Chandrakala et al., 2012).

Par ailleurs le pentylpyrone a été testé à différentes concentrations sur la croissance mycélienne et la germination des sporanges vis-à-vis d'*Alternaria brassicicola*. Les résultats ont montré une inhibition complète de ces paramètres. Aussi, le mycélium et la plupart des spores de l'agent pathogène se sont montrés non viables après avoir été trempés dans une solution de 6 pentyne pyrone (Intana et al., 2008).

Simon et al. (1988) ont rapporté que *T. koningii* produit également le 6-pentyl-alpha-pyrone (6PAP) qui était capable d'inhiber la croissance mycélienne de *Gaeumannomyces graminis*.

Plus tard, Worsatit et *al.* (1994) ont supposé que le même composé joue un rôle important dans le contrôle de rhizoctone sur le blé. Plus récemment, Pezet et *al.* (1999) ont rapporté que ce composé inhibe aussi la germination des conidies et la croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*.

Il a été démontré qu'il est inhibiteur de la production et la germination des conidies, la croissance du tube germinatif et la formation de pigments chez *F. moniliforme* lorsqu'il est ajouté au milieu de culture gélosé.

Il a été également signalé que, la lyse du mycélium de *Sclerotium rolsfii* induite par *Trichoderma harzianum*, se traduit par une rétraction, une vacuolisation de cytoplasme qui illustre le pouvoir mycoparasitaire de cet antagoniste (Keroum, F., 2009).

3.6 Activité antifongique *in vivo* des extraits de filtrats de culture des isolats de *Trichoderma* spp.

Les extraits des 13 isolats de *Trichoderma* spp. ont montré un pouvoir inhibiteur important vis-à-vis des deux isolats de *Phytophthora infestans* sur les disques foliaires de la variété spunta de pomme de terre par rapport aux témoins positifs (Figure 15).

Aucun symptôme n'a été développé par *Phytophthora infestans* après l'application des extraits méthanoliques et d'haxane des filtrats de cultures de l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp. sur les disques foliaires de pomme de terre. Un jaunissement a été noté sur quelques disques foliaires traités par les extraits méthanoliques de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de l'isolat A1.

Figure15 : Pouvoir pathogène de *P.infestans* sous l'effet des extraits methanoliques et d'hexane

a: Selon les extraits methanoliques sur les isolats A1 (a1) et A2 (a2) /Absence du duvet blanchâtre.

b : Selon les extraits d'hexane sur les isolats A1 (b1) et A2 (b2) /Absence du duvet blanchâtre.

c : Témoin positif A1 (c1) et A2 (c2) / Présence du duvet blanchâtre.

6PP qui était présent de tous filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp.

Ces résultats concordent avec ceux montrés par Mpika et al. 2009 qui ont trouvé que les filtrats des isolats de *Trichoderma* spp. ont réduit significativement la taille et la fréquence des lésions nécrotiques développées sur les disques foliaires de cabosses causés par *Phytophthora palmivora*. Des résultats similaires ont été obtenus par Bowers et al. (2001), qui ont confirmé que l'application de *Trichoderma* spp. sur les disques foliaires permettait la réduction des symptômes causés par *Phytophthora megakarya*.

L'efficacité des filtrats de cultures de *T. virens* et *T. viride* sur l'infection des plantes de pomme de terre par *P. infestans* a été étudiée par Chandrakala et al. (2012). Il a été prouvé que *T. virens* a complètement inhibé l'apparition des symptômes. Par contre un taux d'inhibition de 45% a été enregistré par l'application de *T. viride*.

Les mêmes résultats ont été affirmés par Bigirimana et al. (1997), Howell et al. (2000), Sid Ahmed et al. 2000 et Harman et al. (2004), où une réduction considérable des symptômes sur feuilles d'haricot, de coton, de piment et du maïs pré inoculés de *T. virens* et *T. harzianum*, sujettes aux attaques de *Rhizoctonia* sp, *Colletrotrichum* sp et *Phytophthora* sp.

Plusieurs isolats de *Trichoderma* spp. ont été testés sur les feuilles détachées des plants de pomme de terre cultivés dans une serre pour le contrôle du mildiou. Les isolats antagonistes ont montré une réduction de la maladie de 40% comparés aux témoins inoculés uniquement avec l'agent pathogène (Lozoya-Saldalla et al., 2006).

Le 6PP a montré à la fois une activité antifongique *in vivo* et *in vitro* vis-à-vis de plusieurs champignons pathogènes des plantes et une forte relation entre la biosynthèse de ce composé et la capacité de biocontrôle (Scarselletti et al., 1994, Worasatit et al., 1994).

Certains métabolites secondaires de *Trichoderma* spp. peuvent agir comme éliciteurs de plantes des mécanismes de défense contre les pathogènes (Vinale et al.2008).

Une réduction de symptômes engendrés par le *Botrytis cinerea* sur la tomate a été relevée en traitant ces plants par le 6PP . En outre, le traitement du sol par ce composé quatre jours avant l'inoculation de *Fusarium moniliforme* a montré une suppression considérable des fontes de semis et une promotion importante de la croissance des plantes, par rapport au témoin non traité (El-Hasan et al.,2009).

L'application de ce composé sur plants de maïs a nettement amélioré les activités de la peroxydase, la polyphénoloxydase dans les tissus des racines des plants de maïs traduisant une induction de la défense de ces plants (El-Hasan et al.,2009).

Il a été démontré par Vinale et al.,(2012) que, plusieurs métabolites secondaires de *Trichoderma* spp. ont un effet positif sur le développement de la plante .

Aussi, le 6PP ,Koninginins, trichocaranes A - D, harzianopyridone, cyclonerodiol, l'acide harzianolideharzianic sont des composés isolés qui affectent la croissance des plantes (Ghisalberti et al., 1993, Cutler et al.,1991)

En effet, le 6PP est impliqué dans de nombreux processus, Il agit sur la croissance de plusieurs champignons pathogènes et les systèmes racinaires des plantes en augmentant les ramifications (métabolite bioactif végétal) (Vinale et al., 2008)

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion

Notre travail a visé l'étude de l'activité antifongique de la partie non protéique des 13 isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis des deux isolats A1 et A2 de *P. infestans*. Cette étude a permis la mise en évidence 18 groupes chimiques des extraits de filtrats de cultures de 13 isolats de *Trichoderma* spp. par analyse chimique par FTIR, avec certaines similarités entre l'ensemble des isolats de *Trichoderma* spp. et la dominance des acides, des alcanes, des groupes aromatiques et des alcools.

L'analyse chimique par la GC-MS a révélé la présence de 32 composés avec une variabilité entre la composition des extraits méthanoliques et ceux d'hexane des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. Il est important de rappeler l'abondance et la fréquence du composé 6PP peut être responsable du pouvoir antifongique sur les deux types sexuels A1 et A2 de *P. infestans*.

L'activité antioxydante des extraits des filtrats de cultures des 13 isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis du radical DPPH a prouvé leur pouvoir réducteur modéré en comparaison avec le témoin positif représenté par l'acide ascorbique.

Des taux d'inhibition important variant de 94% à 100% ont été enregistrés sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination pour l'ensemble de filtrats de cultures des extraits des 13 isolats de *Trichoderma* spp vis-à-vis des deux types sexuels de *P. infestans*.

Les extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats TC ,TE, TG et TK ont prouvé leur effet fongicide sur les deux isolats A1 et A2 de *P. infestans* avec une inhibition complète de la croissance mycélienne ,sporulation et germination.

Par ailleurs, les extraits méthanoliques et d'hexane des filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp. ont engendré des modifications remarquables sur la morphologie de l'agent pathogène qui, se manifestent par une lyse importante du mycélium ainsi qu'une déformation et un éclatement de sporanges des deux isolats de *P. infestans*.

L'application des différents extraits à base d'hexane et de méthanol des filtrats de cultures des isolats antagonistes. ont prouvé l'inhibition du pouvoir pathogène des deux isolats de *Phytophthora infestans* par l'absence de symptômes du mildiou sur les disques foliaires sains de pomme de terre.

Selon le pouvoir inhibiteur *in vitro* et *in vivo* des différents extraits de filtrats de cultures des isolats de *Trichoderma* spp : les isolats TC, TE, TG et TK peuvent être préconisés dans la lutte contre le mildiou de pomme de terre en Algérie.

En conclusion, les résultats confirment l'efficacité de la partie non protéique des isolats de *Trichoderma* spp. contre *P. infestans*. Le composé 6PP pourrait être responsable de l'activité antifongique..

Plusieurs portes s'ouvrent à la recherche. Il est souhaitable:

- Identifier les 13 isolats de *Trichoderma* spp. par les approches de biologie moléculaire,
- Séparer et tester les différents composés de cette fraction non protéique sur *P. infestans* sous serre et en plein champ pour confirmer le principal composé antifongique et formuler un fongicide,
- Compléter l'étude par un GC-MS en utilisant d'autres types de colonnes capillaires pour identifier les principaux constituants des filtrats isolats de *Trichoderma* spp.,
- Séparer chaque composé chimique identifié par CG-SM et issu des extraits méthanoliques des filtrats de cultures des isolats TC,TE,TG et TK de *Trichoderma* spp. et les tester *in vitro* et *in vivo* sur *Phytophthora infestans*,
- Produire des fongicides à base de ce composé actif majoritaire le 6PP et l'utiliser dans la lutte biologique contre *P. infestans* et d'autres agents pathogènes,
- Déterminer la concentration optimale d'inhibition du *P. infestans* et de réduction du mildiou,
- Etudier les mécanismes de résistance induite par ces métabolites secondaires,
- Tester les différents extraits sur une collection élargie de *P. infestans* de différentes régions du pays, pour mieux contrôler la maladie du mildiou ainsi que les variétés de pomme de terre les plus cultivées et multipliées en Algérie .

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Agrios G.N. (1997).** Plant Pathology, 4th edn. Academic Press, San Diego.
2. **Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De La Cruz J., Monte E., Llobell A., (2001).** An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5833-5839.
3. **Ait Ouada M., Bouznad Z., Kedad A., Mokabli A., Siafa A. et Yahiaoui S.,(2008).**
4. Principaux ravageurs et maladies de la pomme de terre : Agents responsables, dégâts, conditions de développement et méthodes de lutte. *Journée d'étude sur la filière pomme de terre : Situation actuelle et perspectives*. I.N.A. El Harrach, le 18 Juin 2008, Alger.
5. **Alloy J.P., (2009).** La filière pomme de terre en Champagne-Ardenne. Agreste Champagne-Ardenne N° 9. Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche.6p
6. **Alspaught J.A., Perfect J.R., Hatman J.,(1997).** *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and Camp. *Genes.Dev.*11: 3206-3217.
7. **Amrar S.,(2005).** Age physiologique et influence des conditions de stockage sous froid longue durée dans le développement de la culture de pomme de terre d'arrière saison et de primeur. *Macir revue* 2. Algérie : 11-14.
8. **Amrar S., (2013).** Journée de la Pomme de Terre CCI DAHRA Mostaganem. Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles, 18p.
9. **Andriamialisoa Z., Giraud M., Labia R et Valla A., (2004).** Chemical synthesis of 6-pentyl-2H-pyran-2-one: a natural antifungal biosynthesized by *Trichoderma* spp. *Chemistry and Ecology* Volume 20, Issue 1, pages 55-59.
10. **Andrивon D., (1994).** Dynamics of the survival and infectivity to potato tubers of sporangia of *Phytophthora infestans* in three different soils. *Soil Biology and biochemistry*, 26: 945-952.
11. **Andrивon D.,(1996) .** The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*, 45: 1028-1036.

12. **Andriveau D. et Lebreton L.,(1997).** Mildiou de la pomme de terre, ou en sommes-nous après 150 ans ?. *Phytoma*, 494 (5): 24-27.
13. **Anita S.,Ponmurugan.P and Ganesh Babu. R.,(2012).** Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of *Phomopsis* canker disease. *African Journal of Biotechnology*, 11(6): 10350-10357.
14. **Badaoui M., Berkani A., Kolaï N.,(2011).** Etude de certains caractères et systématique de *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera ; Gelechiidae) de différentes régions d'Algérie. *Laboratoire de la production végétale. Université de Mostaganem.* 60-67.
15. **Baker R., (1988).** *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants, *CRC Crit. Rev. biotechnol.*, 7(2) :97-106.
16. **Benhamou N and Cherif M., (1990).** Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 71, 1406-1414.
17. **Benitez T., Rincon A.,Limon M.C., Codon A.C., (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.*, 7: 249-260.
18. **Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J., Elad Y and Hofte M., (1997).** Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 62: 1001-1007.
19. **Bissett J.,(2004).** Commentaires de l'adresse internet suivante : [http ://www.Medicalglossary .org/fungi_ mitosporic _ fungi_ definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).
20. **Bissett J., (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.*, 69 : 2373-2417.
21. **Blumenthal C. Z., (2004).** Production of peptide metabolites in *Aspergillus niger*, *A. oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. pharmacol.*, 39: 214-228.
22. **Boiron P., (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris.,128p.

- 23. Bonnarme P., Djian A., Latrasse A., Feron G., Ginie C., Durand A., (1997).** Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *Journal of Biotechnology*, 56:143–150.
- 24. Bouchet P., Guignard J. L., Pouchus Y. F. et Villard J., (2000).** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés. *Biochimie végétale*. 2^e édition Masson, 274 p.
- 25. Bougandoura N., Bendimerad N.,(2012).** Effet antifongique des extraits aqueux et methanolique de *Satureja calamintha* sp.(Nepeta) briq Revue des Bio Ressources Vol 2 N 1 : 1-7
- 26. Bowers J.H., Bailey B.A., Hebbar P.K., Sanogo S and Lumsden R.D., (2001a).** The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. *Plant Health Progress*, doi: 10. 1094:PHP-2001-0709-O1-RV
- 27. Bowers J.H., Sanogo S., Tondje P.R., Hebbar P. K and Lumsden R.D., (2001b).** Developing strategies for biological control of black pod, monilia podrot, and witches' broom on cacao. In :Proceedings of the 1st West and Central Africa training workshop on biocontrol of plant diseases, with special reference to cacao black pod diseases. 25-29 June, 2001. Douala (Cameroon): 10-16.
- 28. Brewer D., Greenwell M et Taylor A.,(1993).** Studies of *Trichoderma* sp. isolates from *Mytilus eludis* collected on the shores of cape breton and Prince Edward islands.Proc. N. S. Inst. Sci., 1993, 40 (1) : 29-40.
- 29. Brunner K., Peterbauer C.K., Mach R.L., Lorito M., Zeilinger S., Kubicek C.P., (2003).**The Nag1 *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current. Genetics.*, 43: 289-295.
- 30. Calistru C., McLean M. and Berjak P.,(1997).** *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137:115-124.
- 31. Calvo A.M., Gardner H. and Wand Keller N.P., (2001).** Genitic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. biol. Chem.* 276: 20766- 20774.

- 32. Calvo A.M., Wilson R.A., Bock J.W. and Keller N.P., (2002).** Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, 66: 447-459.
- 33. Carrier A. et Sénécal M ., (2008).** Bulletin d'information cultures en serres: un nouveau Fongicide biologique le : PRESTOP.
- 34. Castro A.M., Pedro K.C., Cruz J.C., Ferreira M.C., Leite S.G. and Pereira N.,(2010).** *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant b-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162:2111–2122.
- 35. Chamber et Scott.,(1995).** *In vitro* Antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by Isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology* Volume 143, Issue 8, pages 471–477.
- 36. Champ S.P., Raw P. and Chang A.,(1987).** An endogenous inducer of sexual developement in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1383- 1388.
- 37. Champ S.P. and EL-Zayat A.A.E., (1989).** Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacterial.*, **171**: 3982-3988.
- 38. Chandrakala A., Chandrashekar S.C., Jyothi G. and Ravikumar B. M., (2012).** Effect of cell-free culture filtrates of bio-control agents on the spore germination and infection by *Phytophthora infestans* causing late blight of potato. *Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences*, 1(2) 2012: 40-45.
- 39. Claydon N., Allan M., Hanson J.R. and Avent A.G.,(1987).** Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88: 503–13.
- 40. Chehat F., (2008).** La filière pomme de terre Algérienne : une situation précaire. *Journée*
- 41. d'étude sur la filière pomme de terre : Situation actuelle et perspectives.** I.N.A. El Harrach, le 18 Juin 2008, Alger : 1-11.
- 42. Christine D.S., Roberts W.S. and Fry W.E.,(2000).** Molecular techniques and the mystery of the potato late blight. in *Potato Late Blight Pathogen* p: 21-42.
- 43. Collins R.P. and A.F. Halim.,(1972).** An analysis of the odorous constituents produced by various species of *Phellinus*. *Can. J. Microbiol.*, 18: 65-66.

- 44. Cooney J.M., Lauren D.R., Di Menna M.E.,(2001).** Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 522–526.
- 45. Cournut. B.,(1984).** Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Thèse discipline : Pharmacie : Marseille., 77 p.
- 46. CNCC., (2010).** Bulletin des variétés de pomme de terre. *Editée par le CNCC*,: 253 p.
- 47. Cutler, H.G. and Jacyno, J.M. (1991)** Biological activity of (–)-harzianopyridone isolated from *Trichoderma harzianum*. *Agric Biol Chem***55**, 2629–2631
- 48. Darmayasa B.G., Sentana Putra ., Sujaya I N. and Sukrama I.D.M.,(2014).**The *Trichoderma asperillum* TKD Filtrate Potency in Reducing Contaminants of Aflatoxins B1 Produced by *Aspergillus flavus* FNCC 6109 on Concentrate Feed. *Int. J. Pure App. Biosci.* 2 (6): 279-285.
- 49. Davet P.,(1996).** Vie microbienne du sol et production végétale, 383 p. INRA, Paris (FR).
- 50. Degenkolb T., Berg A., Gams W., Schlegel B. and Grafe U., (2003).** The Occurrence of Peptaibols and Structurally Related Peptaibiotics in Fungi and their Mass Spectrometric Identification via Diagnostic Fragment Ions. *J. Peptide Sci.*, 9: 666–678.
- 51. Degenkolb T., Dohren H.V., Nielsen N.F., Samuels G.J., and Bruckner H.,(2008).** Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem. Biodivers.*, 5: 671-680.
- 52. De La Cruz J., Hidalgo-Gallego A., Lora J. M., Benitez T., Pintor-Toro J.A. and Llobell A., (1992).** Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur J Biochem.* 1992 Jun 15;206 (3):859-67..
- 53. Demain A. and Fang A.,(2000).** The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **69** : 1-39.
- 54. Dennis C. and Webster J., (1971a).** Antagonistic Properties of Species Groups of *Trichoderma*. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57: 25-39.
- 55. Dennis C. and Webster J., (1971b).** Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* (production of non-volatile antibiotics). *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41–48.

- 56. Dodd S.L., Lieckfeldt E., Chaverr I.P., Overton B.E., Samuels G.J.,(2002).** Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs. *Mycological Progress*, 1: 409-428.
- 57. Drenth A., Turkensteen L. J. et Govers F.,(1993).** The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands : Significance and consequences. *Netherland Journal of Plant Pathology*. 99, Supplement 3: 57-67 pp.
- 58. Dubey SC., Suresh M., Singh B.,(2007).** Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceris for integrated management of chickpea wilt. *Biol Cont.*40:118–127
- 59. Dubey S.C., Tripathi A., Dureja P. and Grover A.,(2011).** Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. *Ind. J. Agric. Sci.*, 81: 455–461.
- 60. Duboi.L.,(2009).** Pomme de terre - Mildiou de la pomme de terre : raisonner ses interventions et choisir le fongicide adapté .*Le Syndicat Agricole* (<http://www.syndicat-agricole.com/>) (consulté avril 2015)
- 61. Duvauchelle S. et Andrivon D.,(1996).** Maladies à distribution géographiques mondiale :Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. et Croisnier J. C. ed. INRA et ITCF. France. 607p .
- 62. Elad, Y.,(2000).** *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases –control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biol Control* 10, 499–507.
- 63. El-Hassan A. and Buchenauer H., (2009).** Action of 6-pentyl-alpha pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defense responses in maize. *J. Phytopathol.*, 157:697–707.
- 64. El-Hasan A.,Walker F. and Buchenauer H.,(2008).** *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-Pentylalpha- pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Phytopathology*, 156:79-87.
- 65. El-Hasan A., Walker F., Schoene J. and Buchenauer H.,(2007).** Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *J. Plant. Dis. Prot.*, 114:62–68.

66. Hamed E.R., Hassan M.A., Ghazi E.A., El-Gamal N.G., Shehata H.S., (2015). *Trichoderma asperellum* isolated from salinity soil using rice straw waste as biocontrol agent for cowpea plant pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (2): 091-098.
67. Esposito E. and Silva M., (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24(2): 89-98.
68. Erwin D. C. and Ribeiro O. K., (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minisota, 561 p.
69. Eziashi E.I., Uma N.U., Adekunle A.A., Airede C.E., (2006). Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *African Journal of Biotechnology*, 5: 703-706.
70. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdely C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331(5): 372–379.
71. FAOSAT 2015 : Economie de la pomme de terre <http://agronomie.info/fr/economie-de-la-pomme-de-terre/.consulté> le mois d'Avril 2015.
72. Fry W. E., Goodwin S. D., Matuszak J. M., Spielman L. J., Milgroom M. G. and Drenth, A., (1992). Population genetics and intercontinental migration of *Phytophthora*
73. *infestans*. *Annual Review of phytopathology*, 30: 107-129.
74. Fry W. E and Goodwin S. D., (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*, 81 : 1349-1357.
75. Fujita T., Okuda M., Iida A., Uesato S., Nagaoka Y., takaishi Y., Terada H., (1994). Fungal metabolites. The effect of peptide antibiotics tricosporin Bs, on the respiratory activity of mitochondria. *Biol. Pharm. Bull.*, 17: 482-484.
76. Garnica-Vergara A., Barrera-Ortiz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J., (2015). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytol.* 2016 Mar;209(4):1496-512. doi: 10.1111/nph.13725.

- 77. Gallegly M.E. and Galindo J., (1958).** Mating type and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology*, 48: 274-277.
- 78. Gallegly M. E. and Hong C., (2008).** *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA Fingerprints. *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota USA, 157 p.
- 79. Gams W. and Bissett J.,(1998).** Morphology and identification of *Trichoderma* sp. *Trichoderma and Gliocladium*, 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. :<http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/Genusoverview.cfm>). consulté le Fevrier 2015.
- 80. Gaucher D., Duvauchelle S. et Andrivon D.,(1998).** Mildiou de la pomme de terre : le champignon évolue, la lutte aussi. *Perspectives Agricoles*, **236**: 1-20.
- 81. Genilloud O.,Pelaez F.,Gonzalez I et Diez M.T.,(1994).** Diversity on actinomycetes and seaweeds from the Iberian coasts. *Microbiologia*, 10 : 413-422.
- 82. Geremia R.A., Goldman G.H., Jacobs D., Ardiles W., Vila S.B., Van Montagu M., Herrera- Estrella A.,(1993).** Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, *Mol. Microbiol.*, 8: 603-613.
- 83. Ghisalberti E.L., Narbey M.J., Dewan M.M., Sivasithamparam K.,(1990).** Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant Soil*, 12: 287-291.
- 84. Ghisalberti E.L. and K. Sivasithamparam.,(1991).** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Bioche.*,23: 1011–1020.
- 85. Ghisalberti EL., Rowland CY.,(1993).** Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod.*;56(10):1799-804.
- 86. Gisi U., et Cohen Y.,(1996).** Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*. **34**: 549-572 pp.
- 87. Gnis et Arvalis.,(2008).** Maladies, ravageurs et désordres de la pomme de terre. Guide d'identification et fiches descriptives. *Co-edition: Fnpppt*, 192 p.
- 88. Gond SK., Verma VC., Kumar A., Kumar V., Kharwar RN.,(2007).** Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correa (Rutaceae) from Varanasi (India) *World J Microbiol Biol.*;23(10):1371–137

- 89. Goodwin S. B., Cohen B. A., Deahl K. L. and Fry W. E., (1993).** Migration from northern Mexico as probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84 : 553-558.
- 90. Goodwin S.B.,(1997).** The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87: 462-473.
- 91. Guoliang Y.G., Wang W., Sha S., Liu L et Yu X.,(2010).** Inhibition and control effects of the ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermented broth against *Botrytis cinerea*, *African Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 15, pp. 1647-1653.
- 92. Haikal N.Z., (2008).** Effect of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. *J. Applied Sci. Res.*, 4: 48-52.
- 93. Haine D. et Verlaine A., (2006).** Asbl Pameseb : Un réseau de stations météorologiques automatiques télémesures. *Direction Générale de l'Agriculture de la région Wallonne*, 42 p.
- 94. Hammi A.,(2003).** Caractérisation de populations de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barydans la région de Saïs. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ibn Abdollah. Fes. Maroc : 272 p.
- 95. Hanson J.R.,(2005).** The chemistry of the bio-control agent, *Trichoderma harzianum*. *Science Progress*, 88: 237–248.
- 96. Harman G.E., Howell R.C., Viterbo A., Chet I., and Lorito M.,(2004).** *Trichoderma* species –opportunistic, avirulent, plant symbionts. *Nature reviews, Microbiology*, 2 : 43-56.
- 97. Harman G.E.,(2006).** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 96 : 190-194.
- 98. Harman G.E.,(2011).** *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39: 103-108.
- 99. Harrison J. G. and Lowe R.,(1990).** Effects of humidity and air speed on sporulation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. *Plant Pathology*, 38 : 585-591.
- 100. Hapwood D.A., (1988).** Toward's and under standing of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Land B.*, **235**: 121-138.

- 101.Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N.,(1995).** Dictionnaire of the fungi, 8th ed. CAB. *International Walling Ford*. United Kingdom, 616 p.
- 102.Henfling J.W.,(1987).** Le mildiou de la pomme de terre. Bulletin d'information technique, C. I. P, Lima Pérou, 23-30 p.
- 103.Howell C.R., Hanson L.E., Stipanovic R.D. and Puckhaber L.S. , 2000.** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 248-252.
- 104.Howell C.R.,(2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, 87: 4-10.
- 105.Hawkes J. G.,(1990).** The potato, evolution, biodiversity and genetic resources. *Belhaven Press* , London, 259 p.
- 106.Ibarra-Medina V.A., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Lara-Hernández M.E. et Valdez-Carrasco, J.M.,(2010).** Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revista Mexicana de Micología*, 31, 53-63
- 107.Hohl, H. R. et Iselin, K. 1984.** Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland and with A2 mating type behavior. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 529-531 pp.
- 108.INPV.,2010-2013 :** Bilan de l'enquête sur le mildiou de la pomme de terre :Dépistage de la souche du type A2 au niveau des zones à vocation pomme de terre de l'Algérie.
- 109.Intana W.,Chamswarng C., Chantrapromma K.,Yenjit P., Suwanno C. and Sattasakulchai S., (2008).** Use of Pentyl Pyrone Extracted from Ultraviolet-induced Mutant Strain of *Trichoderma harzianum* for Control Leaf Spot of Chinese-kale. *Thai. Journal of Agricultural Science*, 41(3): 75-80.
- 110.Intana W., Suwanno C., Chamswarng C., Issarakraisila M., Koysomboon S. and Chantrapromma K.,(2008).** Bioactive Compound of Antifungal Metabolite from *Trichoderma harzianum* Mutant Strain for the Control of Anthracnose of Chili (*Capsicum annuum* L.) *Philipp. Agric. Scientist.*, 92 (4) : 392-397.
- 111.INVA., (2007).** La culture de la pomme de terre. *Agriculture et développement n°08*. Revue de vulgarisation et de communication éditée par l'INVA : 49-60 p.

- 112. Jae-Hyuk Y. and Keller N. P., (2005).** Regulation of secondary metabolite in filamentous fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 43: 437- 458.
- 113. Jayalakshmi S.K., Raju S., Usha-Rani S., Benagi V.I. and Sreeramulu K.,(2009).** *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum L.*) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*. *Australian Journal of Crop Science*, 3(1): 44-52.
- 114. Journal Officiel N° 07 du 28 Janvier 2009,** fixant la liste provisoire des espèces et variétés de céréales, de pomme de terre et des espèces arboricoles et viticoles autorisées à la production et à la commercialisation : 17-20.
- 115. Kawamura C., Tsujimoto T and Tsug T.,(1999).** Targeted disruption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the Japanese strain pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 12: 59- 63.
- 116. Keller N. P and Woobok J.,(2005).** A global regulatory of secondary metabolite biosynthesis in fungi , (edn) Warfe.
- 117. Kerroum F.I.,(2009).** Caractérisation génétique par compatibilité végétative et l'effet de certains triazoles sur la croissance de *Fusarium oxysporum fsp radicis- lycopersici* thèse université d'Oran ,145p.
- 118. Kerroum F.I., Karkachi N., Henni J. Edinne., Kihal M.,2015.** Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* in the North-west of Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 6 (4): 44-53.
- 119. Keszler A., Forgacs E., Kotai I., Vizcaíno J.A., Monte E. and García-Acha I., (2000).** Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatograph. Sci.*, 38: 421-422.
- 120. Klarfeld, S., Avia R. et Cohen. Y., (2009).** Pathogenic Fitness of Oospore Progeny
- 121. Isolates of *Phytophthora infestans* on Late-Blight-Resistant Tomato Lines.** The Mina & Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, Israel. The American Phytopathological Society.
- 122. Ko W. H.,(1988).** Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 26 : 57-73.
- 123. Kohlmeyer J., (1979).** *Marine mycology: the higher fungi*. New York : Academic press, 61

- 124.Kroon L.P.N.M., Bakker F.T.,van den Bosch G.B.M., Bonants P.J.M et Flier W.G., (2004).**Phylogenetic analysis of Phytophthora species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genet. Biol.* 41: 766-782.
- 125.Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. and Szakacs G., (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biology*, 38 (3) : 310-319.
- 126.Kuepper G. et Preston S.,(2004).** Solutions biologiques de lutte contre le mildiou de la pomme de terre.
- 127.Laing C., (1998).** Le mildiou de la pomme de terre. Bulletin d'information de la division de la gestion des demandes d'homologation et de l'information. *Agence de Réglementation de la Lutte Parasitaire*, Canada, juin 1996.
- 127.Landreau A., (2001).** Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii Oudemans* isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. de Pharmacie : Nantes, France, 201 p.
- 128.Laumonier R., (1979).** Cultures légumières et maraichères. Tome 3. Haut feuille, Paris, 274p.
- 129.Lepoivre P., (2003).** Phytopathologie. Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de luttés. *De Boeck. Les presses agronomiques de Gembloux*. Bruxelles : 427 p
- 130.Leuchtman A., Petrini O. and Samuels G., (1996).** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3): 384-394.
- 131.Lieckfeldt E., Samuels G.J., Börner T., Gams W.,(1998).** *Trichoderma koningii*: neotypification and *Hypocrea* teleomorph. *Can. J. of Bot.*, 76: 1507-1522.
- 132.Liberra K. et Lindequist U.,(1995).** Marine fungi – A prolific resource of biologically active natural products.*Pharmazie*, 50 : 583- 588

- 133.Lillard-Roberts S.,(2004).** *Trichoderma harzianum*. Mold-Help [en ligne].[consulté le avril 2015]. Disponible sur : <http://mold-help.org/content/view/431/Lillard-Roberts>
- 134.Lorito M., Hayes C.K., Dipietro A., Woo S.L. and Harman G.E.,(1994).** Purification, characterisation and synergistic activity of glucan 1,3-b-glucosidase and N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84: 398–405.
- 135.Lorito M., Peterbauer C., Hayes C. K., and Harman G. E.,(1994).** Synergistic interaction *between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination*. *Microbiology*, 140: 623-629.
- 136.Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M., Transmo A., Woo S.L., Dipietro A.,(1993).** Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302–307.
- 137.Lozaoya-Saldaña H., Manuel H., Coyote-Palma, Ronald Ferrera-Cerrato y M., Encarnación Lara-Hernández.,(2006).** Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. microbial antagonism against *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 40: 491-49.
- 138.Lynch J.M.,Lumsden R.D., Atkeyet P.T., et Ousley,M.A. (1991a).** Prospects for control of Pythium damping-off of lettuce with Trichoderma, Gliocladium and Enterobacter spp. *Biol. Fertil. Soils* 12 : 95-99.
- 139.Lynch J.M., Wilson K.L., Ousleyet M.A. et Whipps J.M., (1991b).** Response of lettuce to Trichoderma treatment. *Lett. Appl.Microbiol.* 12 : 56-61
- 140 .Mahesh B., Tejesvi M.V., Nalini M.S., Prakash H.S., Kini K.R., Subbiah V., Shetty HS.,(2005).** Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Curr Sci* 88: 218–219
- 141 Malajczuk N., (1983).** Microbial antagotism to Phytophthora. pp197-218. In Erwin, D. C.,Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. pp392.
- 142 Mapleston R.A., Stone H.G., Williams P.H.,(1992).** *The evolutionary role of secondary metabolite*. *Review.Gen.*, 115: 151-157.
- 143 Martin J. F.,(2004).** *Culture de la pomme de terre de conservation*. Arvalis. Institut du végétal : 4-11.

- 144 Mohamed-benkada M.,(2006).** Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. *Th. Pharmacie* : Nantes, France : 152p.
- 145 Molyneux P.,(2004).**The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 211-219.
- 146 Montarry J.,(2007).** Réponse adaptative des populations de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *Solanum tuberosum*. *Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes*, France, 177 p.
- 147.Monte E. and Liobell A.,(2003).** *Trichoderma* in organic agriculture, Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate) 2003.725-148
- 148 Moumene S., Sadek D., Laïdani M., Houmani Z. et Bouznad Z., (2012).** In vitro antifungal activity of a range of aqueous extracts of plants against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Causal agent of late blight of the potato *Solanum tuberosum* L. in Algeria. International Symposium: « Crop Protection Management in Mediterranean Organic Agriculture » May 14 -16, 2013. Sousse (Tunisia). 5p.
- 149 Mpika J.H., I.B. Kebe, I.S. Druzhinina, M. komon-Zélazowska, C.P. KUBICEK and S. AKÉ, 2009.** Inhibition de *Phytophthora palmivora*, agent de pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire, par *Trichoderma* sp. *Sciences and Nature*, 6: 49 – 62.
- 150 Mulder A. and Turkensteen L. J., (2005).** Potato diseases, Diseases, pests and defects.*NIVAP* : 280 p.
- 151 Mu'ayad Al-Obaidy O. AND Al-Rijabo A.M., (2010).** Antagonistic Activity and Production of Antifungal Compound(s) from selected *Trichoderma* spp. *J. Edu. Sci.*, 23 (3): 10p.
- 152 Nahed Haikal.,(2008).** Control of *Rhizoctonia solani* in Soybean (*Glycin max* L) by seed-coating with *Trichoderma viride* and *Gliocladium virens* spores. *Journal of Applied Biosciences*, (2008). Vol.1 (2): 34 - 39

- 153 Niederhauser J.S.,(1991).** *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. In: *Phytophthora* (J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw & L.R. Cooke eds., Cambridge University Press, 25-45 pp.
- 154 Noronha E.F. and Ulhoa C.J.,(1996).** Purification and characterization of an endo- β -glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, 42: 1039-1044.
- 155 Olejníková P.,Hudecová D., Burgstaller W., Varečka L.,(2011).**Transient excretion of succinate from *Trichoderma atroviride* submerged mycelia reveals the complex movements and metabolism of carboxylates in *Antonie van Leeuwenhoek* 100(1):55-66.
- 156 Oussaid Y.,Bouakaz K.,INPV (2013).**Enquête sur le mildiou de la pomme de terre en Algerie: évaluation de l'efficacité des fongicides vis-à-vis du mildiou de la pomme de terre.
- 157 Oswaldo., (2010).** Hommage à la pomme de terre. Heds.Haute école de santé Genève. Filière nutrition et diététique .11p
- 158 Paitier G.,(1980).** Le mildiou de la pomme de terre. *Phytoma* (4): 23-27.
- 159 Papavizas G.C., (1985).** *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23 : 23-54.
- 160 Pathak N. and Clarke D. D.,(1987).** Studies on the resistance of the outer cortical tissues of the tubers of some potato cultivars to *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular of Plant Pathology* 31 : 57-73.
- 161 Perón., (2006) .** Références production légumières 2eme Edition. synthèse agricole P :538 -547.
- 162 Pezet R., V. Pont R., Tabacchi.,(1999).** Simple analysis of 6-pentyl-alpha-pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochem. Anal.*, 10: 285-288.
- 163 Prieto A.,Leal J.A., Poveda A., Jiménez-Barbero J., Gómez-Miranda B.,Domenech J. ,Ahrazem O.,et Bernabé M.,(1997).** Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species.*Carbohydrate Research*, , 304 (3-4) : 281-291.

- 164 Radtke W. et Rieckmann W., (1991).** Maladies et Ravageurs de la Pomme de Terre. *Th.Mann, Gelsenkirchen-Bue*, Canada, 120 p.
- 165 Ramanathan G., Sundar M.S., Vinodhkumar T.and Ramanathan G.,(2013).** Evaluation of antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* species against fungal phytopathogens. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 3 (5): 528-538.
- 166 Ramasamy M., Varatharaju A., Annamalai P., (2013).** Studies on the Compounds and its antifungal potentiality of Fungi Isolated from Sugarcane field soils of Harur, Dharmapuri District. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 22 (26): 140-142.
- 167 Rapilly F.,(1968).** Les techniques de mycologie en pathologie végétale .Edition Annales des Epiphyties , 103 p.
- 168 Reckhaus P., (1997).** Maladies et ravageurs des cultures maraîchères à l'exemple de Madagascar. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH*, Allemagne. 372 p.
- 169 Reithner B., Schuhmacher R., Stoppacher N., Pucher M., Brunner K. and Zeilinger S., (2007).** Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1123–1133.
- 170 Rifai M.A.,(1969).** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia*, 116: 1-56.
- 171 Roquebert M.F. , 1996.** Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.
- 172 Rousselle P., Robert Y. et Grosnier J.C., (1996).** La pomme de terre production, amélioration, ennemis, maladie et utilisation. I.N.R.A. Paris, 607 p.
- 173 Ruocco M., Lanzuise S., Vinale F., Marra R., Turra D., Woo S.L., Lorito M., (2009).** Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant–pathogenic fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22: 291-301.
- 174 Samuel G.J.,(2006).** *Trichoderma*: systematics, the sexual state and ecology. *Phytopathology*, 96: 195-206.

- 175 Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 270-276.
- 176 Sandgren, M.; Stahlberg, J. & Mitchinson, C. ., 2005.** Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 89 : 246-291.
- 177 Sasser J. N. and Carter C.C.,(1985).** An advanced treatise on *Meloidogyne*, 1 : Biology and control. *Printed by North Carolina State University Graphics*. U.S.A , 422 p.
- 178 Scarselletti R. and Faull J.L.,(1994).** *In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum* in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Mycol. Res.*, 98: 1207-1209.
- 179 Schirmböck M., Lorito M., Wang Y.L.,(1994).** Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol.* ;60:4364–70.
- 180 Shafiquzzaman S., Cheong B.E., Taslima K., Kausar H. and Mainul M.d.H.,(2012).** 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.
- 181 Shaw D. S., Fyfe A.M., Hibberd P.G. and Abdel-Sattar M. A., (1985).** Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. *Plant Pathology*, **34** : 552-556.
- 182 Schuster A. and Schmoll M.,(2010).** Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87: 787-799.
- 183 Sediqi M., Carroll R. B. and Morehart A. L.,(1997).** First report from Morocco of *Phytophthora infestans* isolates with metalaxyl resistance. *Plant Disease*, 81 : 831.
- 184 Sivan A. and Chet I.,(1989).** The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathol.*, 79: 198-203.

- 185 Sid Ahmed A., Sanchez P.C. and Candela E.M.,(2000).** Evaluation of induction systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European journal of plant pathology*, 106 : 824-824.
- 186 Simon A., Dunlop R.W., Ghisalberti E.L. and Sivasithamparam K.,(1988).** *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil. Biol. Chem.*, 20: 263-264.
- 187 Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L.,(1998).** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Harman GE, Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. London: vol.1.Taylor and Francis; 1998. pp. 139–192.
- 188 Soltner D., (2005).** Les grandes productions végétales. 20^{ème} édition. *Collections Sciences et Techniques agricoles*, 472 p.
- 189 Spielman L.J., Drenth A., Davidse L.C., Sujkowski L.J., Gu W., Tooley P.W. and Fry W.E., 1991.** A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, **40**: 422-430.
- 190 Schirmböck M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G.E. and Kubicek C.P., (1994).** Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microb.*, 22 : 4364-4370.
- 191 Smoot J.J., Gough F.J., Lamey H.A., Eichenmuller J.J. et Gallegly M.E., (1958).**
Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **48** : 165-171.
- 192 Stone M.J. and Williams D.H., 1992.** On the evolution of functional secondary metabolites (Natural products). *Mol. Microbiol.*, 6: 29-34.
- 193 Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R. and Schuhmacher R.,(2010).** Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME- GCMS. *J. Microbio. Methods*, 81: 187-193.

- 194 Stoppacher N., Neumann NK., Burgstaller L., Zeilinger S., Degenkolb T., Brückner H., Schuhmacher R.,(2013).**The comprehensive peptaibiotics database. *Chem Biodivers.* 2013; 10:734–743. doi: 10.1002/cbdv.201200427.
- 195 Struik P.C. and Wiersema S.G.,(1999).** Seed potato technology. *Wageningen Pers. Netherland*,: 383 p.
- 196 Svetlana Zivkovic S., Stojanovic Z., Ivanovic V., Gavrilovic Tatjana P. and Balaz J., (2010).** Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Science., Belgrade*, 62(3): 611-623.
- 197 Sugiyama J.,(1987).** Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo: *Elsevier*, 325 p.
- 198 Saran Sundar M.,VinodhkumarT., Ramana G., (2013).**Thanevaluation of antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* species against fungal phytopathogens ,*IJSID An International peer Review Journal for Science* 3 (5), 528-538
- 199 Swiezynski K. M. and Zimonoch-Guzowska E., (2001).** Breeding potato cultivars with tubers resistant to *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 44 : 97-117
- 200 Tarus P.K., Lang'at-Thoruwa C.C., Wanyonyi A.W. and Chhabra S.C.,(2003).** Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*,17(2), 185-190
- 201 Thurston H.D. and Schltz O., 1981.** Late blight in compendium in potato disease. *Hookereditions. APS Press Michigan. USA.* 40-42 p.
- 202 Tooley P. W., Fry W. E. and Villarreal G. M. J., (1985).** Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* population. *Phytopathology*, 76 : 431-435.
- 203 Tooley P. W., Sweigard J. A. and Fry W.E., 1986.** Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual population. *Phytopathology*, 76 : 1029-1212.
- 204 Trail F., Mahinti N., Linz J.,(1995).** Molecular biology of aflatoxine biosynthesis. *Microbiology.* 141: 755-765.

- 205 Vartanian V. G. and Endo R. N.,(1985).** Overwintering hosts, compatibility types, and races of *Phytophthora infestans* on tomato in southern California. *Plant disease*, 69: 516-519.
- 206 Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. and Valero J.R.,(2007).** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.*, 37: 1-20.
- 207 Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., (2008).** A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants; *Physiological and Molecular Plant Pathology*, (2008); 72: 80–86.
- 208 Vinale F., Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S., Lorito M., (2009).** Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48:705-711
- 209 Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti EL., Ruocco M., Woo S. et Lorito M., (2012).** *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Nat Prod Commun* 7: 1545–1550
- 210 Vining L.C.,(1990).** Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44 : 395-427.
- 211 Viterbo A., Ramot O., Chemin L. and Chet I.,(2002).** Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Leeuwenhoek*, 81: 549-556
- 212 Vizcaino J.A., Sanz L., Cardoza R.E., Monte E. and 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.
- 213 Wada S.I. and Tanaka R.A., (2004).** Novel 11-residual peptaibol-derived carrier for *in vitro* oligodeoxynucleotide delivery into cell. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 2563-2566. Verbist, J-F., 2000 Marine fungal substances in : studies in natural products chemistry Londres: Elsevier sciences B.V., 24:979-1092

- 214 Walmsley-Woodward D. J. and Lewis, B. G., (1977).** Laboratory studies of potato tubers resistance to infection by *Phytophthora infestans*. *Annual of Applied Biology* 85 : 43-49.
- 215 Weindling, R., and Emerson, H.,(1936).**The isolation of toxic substance from the culture filtrates of *Trichoderma*. *Phytopath.* 26, 1068 – 1070.
- 216 Widden P. and Scattolin V., (1988).** Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* spp. colonizing spruce. *Mycologia*, 80:795-803.
- 217 Widden,P. and Abitbol J.J.,(1980).** Seasonality of *Trichoderma* species in a spruceforest soil. *Mycologia*, 72 : 775-784.
- 218 Worasatit, N. and Sivasithambaram, K., Ghisalberti, E. L. and Rowland, C. 1994.** Variation in the pyrone production, lytic enzyme and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycol. Res.* 98: 1357-1363.
- 219 Zouai C.A.,INPV (2010).** Enquête sur le mildiou de la pomme de terre :Dépistage de la souche du type A2 au niveau des zones à vocation pomme de terre de l'Algérie.

Site internet

jean-jacques.auclair.pagesperso-orange.fr/ftirUV/protocole.htm