

REPEBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE et AGRO-ÉCOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Option : Biotechnologie Microbienne

Thème

Formulation de biopesticides en agriculture

Présentés par :

DAOUADJI Bouchra

TOUMI Nesrin ibtissem

Devant le jury :

BENCHABANE M.	Professeur	U.BLIDA 1	Président
AMMAD F.	M.C.A	U.BLIDA 1	Promotrice
MEKHALDI D.	Docteur	U.BLIDA 1	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2021/2022

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions Allah, le tout puissant, de nous avoir donné la volonté, patience, la santé, et la force pour survivre, ainsi que la persévérance pour dépasser toutes les difficultés.

Nous tenons tout d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères à notre promotrice **M^{me} AMMAD. F**, Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de diriger et d'encadrer ce travail. Nous vous remercions pour votre disponibilité, vos conseils précieux et votre soutien pendant la réalisation de ce mémoire. Nous espérons avoir été à la hauteur de vos attentes. Nous garderons un excellent souvenir de votre extrême gentillesse. Nous n'aurons pas assez de ces quelques lignes pour vous exprimer nos sincères remerciements et notre profond respect.

Nous remercions par la suite très vivement **P^r. BENCHABANE. M** d'avoir accepté être président de jury.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à **M^{elle} Mekhaldi. D** d'avoir accepté d'examiner notre travail avec bienveillances et nous en sommes très honorées.

Nous remercions ainsi **M^r. Boutoumiet M^r. Bani** de nous avoir aidé à la réalisation de notre travail.

Un grand merci également à **Belarbi ihcene**, ingénieur de laboratoire, pour sa disponibilité et ses encouragements durant toute l'expérimentation.

Nos grands remerciements sont formulés à tous **les enseignants de la spécialité Biotechnologie Microbienne.**

Dédicace

C'est avec un très grand honneur une aimance joie que je dédie ce mémoire à toute personne m'ayant apporté soutient et aide que ce soit matériel ou morale pour la confection de ce modeste mémoire.

*Je suis reconnaissante envers **Mes parents (Mourad et Aïcha)** dont l'amour et le soutien constants me gardent motivée et confiante. Mes réalisations et mon succès sont dus au fait qu'ils ont cru en moi. Je mets aujourd'hui entre vos mains le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être toujours avec moi. Je ne pourrai jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi.*

*Un grand merci à mes frères **Riadh et Abdeldjalil**, qui me gardent les pieds sur terre, me rappelle ce qui est important dans la vie et me soutiennent toujours dans mes aventures.*

*Chères **Asma, Fella et yasmine** merci pour tout, merci pour vos soutiens, merci pour vos compréhensions et vos patiences, merci pour votre temps et vos efforts, vous m'avez secouru dans les pires moments de ma vie. C'est durant ces moments de détresse que les vrais amis se reconnaissent parmi les autres.*

Je remercie ma famille et mes proches pour leurs patiences, aide et soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail.

*A l'amie de ma vie **Nesrine**, le chemin que nous avons commencé ensemble s'est terminé, de nombreuses années, des situations, des souvenirs, des personnes que nous avons connues et quittées, mais nous resterons ensemble pour toujours. Je vous dis, nous voici arrivés avec notre fatigue et nos efforts.*

Bouchra

Dédicace

*Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU** de m'avoir donné la force et le courage de mener.*

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

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **ELHADI**.*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **NASSIBA**.*

*A mon frère **MUSTAPHA**, et mes chères sœurs **HIBA** et **HADIL**, qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.*

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

*A tous mes amis, tout particulièrement mes sœurs **NESRINE** et **MAROUA**, qui m'ont*

Toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.

*Sans oublier ma sœur avant d'être mon binôme **BOUCHRA** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

Nesrin

Formulation de biopesticides en agriculture

Résumé :

La lutte chimique est la méthode la plus utilisée pour contrôler les maladies des plantes. Cependant, l'utilisation abusive des pesticides en agriculture représente un risque pour la santé humaine et l'environnement. Toutefois, l'agriculture durable a orienté de nombreuses approches et techniques comme alternative potentielle pour réduire les méfaits des produits chimiques. L'une de ces stratégies est l'utilisation du biopesticides à base de microorganisme ou des plantes pour le contrôle des maladies qui menacent les différentes cultures.

Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, les espèces de *Trichoderma* qui ont prouvé leur pouvoir stimulant et antagoniste.

L'objectif de cette étude a porté sur la comparaison de l'efficacité de la souche *Trichoderma* sous différentes formes : à l'état frais, lyophilisée et formulé *in vitro* contre le *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*, agent pathogène du flétrissement chez le pois. Les résultats obtenus ont montré *in vitro* une réduction significative de la croissance du *Fusarium oxysporum* traité par *Trichoderma* par rapport au témoin. Nous avons enregistré un pourcentage d'inhibition de 73% en confrontation directe et d'une moyenne de 46.15% en confrontation indirecte. *Trichoderma* sp a révélé aussi une bonne activité antifongique contre le phytopathogène testé, que ce soit à l'état lyophilisé ou formulé, nous avons noté un pourcentage d'inhibition de 76.92 % et de 100%. respectivement.

Mots clés : Formulation, biopesticides, *Trichoderma* sp, *Fusarium* sp, activité antagoniste, lutte biologique, biocontrôle.

Biopesticides of formulation in agriculture

Abstract:

Chemical control is the most widely used method for controlling plant diseases. However, the misuse of pesticides in agriculture poses a risk to human health and the environment.. However, sustainable agriculture has guided many approaches and techniques as a potential alternative to reduce the harms of chemicals. One of these strategies is the use of microorganism- or plant-based biopesticides for the c diseases of control that threaten different crops.

Among the microorganisms successfully tested, the species of *Trichoderma* have proven their stimulating and antagonistic power.

The objective of this study was to compare the efficacy of the *Trichoderma* strain in different forms: fresh, lyophilisation and formulated in vitro against *Fosarium oxysporum*, pea wilt pathogen. The results obtained showed that in vitro a significant reduction in growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi treated with *Trcichoderma* versus control.. We recorded an inhibition percentage of 73% in direct confrontation and an average of 46.15% in indirect confrontation.

Trichoderma sp also showed good antifungal activity against the tested plant pathogen, whether lyophilized or formulated, we noted an inhibition percentage of 76.92% and 100%. respectively.

Keywords : Formulation, biopesticides , *Trichoderma sp*, *Fusarium sp*, antagoniste activity, biological control, biocontrol.

صياغة المبيدات الحيوية في الزراعة

: ملخص

المكافحة الكيميائية هي الطريقة الأكثر استخدامًا لمكافحة أمراض النبات. ومع ذلك، فإن إساءة استخدام مبيدات الآفات في الزراعة تشكل خطراً على صحة الإنسان والبيئة. غير أن الزراعة المستدامة ووجهت العديد من النهج والتقنيات كبديل محتمل للحد من أضرار المواد الكيميائية. وتتمثل إحدى هذه الاستراتيجيات في استخدام المبيدات الحيوية أو النباتات القائمة على الكائنات الحية الدقيقة لمكافحة الأمراض التي تهدد المحاصيل المختلفة. من بين الكائنات الحية الدقيقة التي تم اختبارها بنجاح، أثبتت أنواع *Trichoderma* قوتها التحفيزية والعدائية.

كان الهدف من هذه الدراسة هو مقارنة فعالية سلالة *Trichoderma* بأشكال مختلفة: في حالته الطبيعية، مجفف بالتجميد ومركب في المختبر ضد *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi، ممرض ذبول البازلاء. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في المختبر انخفاضاً كبيراً في نمو *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi المعالج بـ *Trichoderma*. سجلنا نسبة تثبيط بلغت 73% في المواجهة المباشرة ومتوسط 46.15% في المواجهة غير المباشرة.

أظهر *Trichoderma* sp أيضاً نشاطاً جيداً مضاداً للفطريات ضد مسببات الأمراض النباتية المختبرة، سواء في حالة التجميد أو التجفيف، لاحظنا نسبة تثبيط تبلغ 76.92% و 100%. على التوالي.

الكلمات المفتاحية: صياغة ، المبيدات الحيوية ، *Fusarium* sp، *Trichoderma* sp ، نشاط مضاد ، مكافحة الحيوية ، مكافحة البيولوجية.

Liste des Abréviations

Bt : *Bacillus thuringiensis*

DP : Poudre de poussière

GR : Granules

SD : Enrobage de semences

WP : Poudre mouillables

WDG : Granulés dispersibles dans l'eau

SE : Suspo-emulsion

SC : Suspension concentrée

DO : Dispersion d'huile

CS : Capsule suspension

ULV : Liquides à ultra faibles volume

EO : Eau dans l'huile

EW : Huile dans l'eau

PDA : Potato dextrose Agar

PIPs : Plantes à pesticides integers

PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

PGPF : Plant Growth-Promoting Fungi

Liste des Figures

Figure 1 . <i>Trichoderma harzianum</i>	8
Figure 2.Action antifongique de <i>Trichoderma</i>	9
Figure3.Schéma montrant la confrontation à équidistance du l'agent pathogène et de <i>Trichoderma</i> sp sur milieu PDA.....	26
Figure 4.Schéma montrant la confrontation à distance.	27
Figure 5. Aspect macroscopique (A) et microscopique (B,C,D,E) de <i>Trichoderma</i> sp.....	30
Figure 6. Aspect macroscopique de l'agent phtyopathogène.....	31
Figure 7. Lyophilisat de <i>Trichoderma</i> sp.....	31
Figure 8. <i>Trichoderma</i> sp formulé.....	31
Figure 9. L'effet inhibitrice de l'agent antagoniste lyophlisé sur l'agent phytopathogène.....	33
Figure 10. L'effet inhibitrice de l'agent antagoniste formulé sur l'agent phytopathogène.....	33
Figure 11. Pourcentage d'inibition de mycélium de pathogène par le <i>Trichoderma</i> à l'etat frais, lyophilisé, formulé.....	34

Liste des Tableaux

Tableau 1. Quelques biopesticides commercialisés_Example of marketed biopesticides.....	10
Tableau 2. Différentes types d'adjuvants ou additifs utilisés dans la formulation des produit.....	15
Tableau 3. Caractéristiques des souches fongiques	25
Tableau 4. L'effet inhibiteur de <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne de souche pathogène (confrontation directe et indirecte) après 7 jours d'incubation.	32

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	16
CHAPITRE.I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
I. Microorganismes et leurs applications en biotechnologie.....	3
II. Les biopesticides	4
II.1. Définition de biopesticide.....	4
II.2. Les différentes catégories de biopesticides	4
II.3. Les exemples d'application des biopesticides.....	10
II.4. Les avantages et les inconvénients de biopesticides.....	12
II.5. Économie des biopesticides.....	13
III. La formulation.....	14
III.1. Généralité.....	14
III.2. Les principaux additifs et adjuvants utilisés dans la formulation	14
III.3. Formulation des biopesticides	18
III.4. Les fonctions de base de la formulation	19
CHAPITRE.II. Matériel et méthodes	3
I. Matériel	24
I.1. Matériels non biologiques	24
I.2. Matériels biologiques	24
I.3. Milieux de culture.....	25
II. Méthode.....	25
II.1. Purification des champignons	25
II.2. Lyophilisation	25
II.3. Formulation sèche de l'agent antagoniste Trichoderma sp (poudre mouillable).....	25
II.4. Activité antagoniste in vitro.....	26
II.5. Activité antagoniste in vitro de Trichoderma lyophilisé et formulé	27
CHAPITRE.III. Résultats et Discussion	25
I. Caractérisation phénotypique des souches fongiques étudiés	29
I.1. Étude macroscopique de Trichoderma.....	29
I.2. Étude macroscopique de Fusarium	31

II. Aspect de l'agent antagoniste après lyophilisation et la formulation	31
III. Résultat du Pouvoir antagoniste de Trichoderma à l'état frais vis-à-vis de l'agent phytopathogène in vitro	32
III.1. Confrontation directe sur milieu.....	32
III.2. Confrontation à distance.....	32
IV. Résultat du Pouvoir antagoniste de Trichoderma lyophilisé et formulé vis-à-vis de l'agent phytopathogène in vitro.....	33
IV.1. Confrontation directe sur milieu de culture.....	33
Conclusion.....	38
Références bibliographiques.....	30
ANNEXES.....	43

Introduction

Dans les dernières années, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure (Atamana et *al.*, 2008). Les maladies et les bioagresseurs des cultures constituent l'une des causes principales des pertes de rendement ou la qualité des récoltes dans le monde (Lepoivre, 2003).

Les pesticides, ou produits phytosanitaires, sont des substances organiques utilisées pour protéger les plantations des maladies, des mauvaises herbes et des micro-organismes nocifs.

Il est admis maintenant par tous que la lutte chimique a des conséquences néfastes sur l'environnement, entre autre, par la toxicité dans la chaîne trophique, la pollution des eaux de surface et souterraine, sur la santé humaine par des intoxications chroniques, des intoxications aiguës, des cancers, des effets sur les systèmes neurologique et des effets sur les systèmes immunologique et reproductif. C'est pour quoi, aujourd'hui, pour des raisons écologiques et économiques, il est nécessaire de se tourner vers des alternatives non toxiques, tel que la lutte biologique qui offre des potentialités de contrôle des maladies où certains agents antagonistes sont capables de contrôler des maladies contre lesquelles aucun moyen de lutte chimique ou résistance de l'hôte n'existe, et avec moins de contraintes environnementales que les pesticides (Hanson et Howell, 2002). Ces dernières années la lutte biologique par l'utilisation d'agents antagonistes fongiques et bactériens a été envisagée contre le *Fusarium oxysporum*. Ainsi des isolats de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., et des isolats non pathogènes de *F. oxysporum* isolés à partir de la rhizosphère du pois chiche, ont montré leur efficacité dans la suppression de la fusariose du pois chiche sous des conditions contrôlées. Par conséquent, la lutte biologique pourrait offrir des potentialités pour la suppression de la fusariose en plein champ, particulièrement lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des cultivars partiellement résistants et un choix adéquat de la date de semis (Landa et *al.*, 2004).

Les biopesticides sont maintenant considérés comme une composante des systèmes de lutte intégrée, dans les quels, ils constituent une des méthodes de lutte que les agriculteurs peuvent utiliser pour lutter durablement contre les ennemis des cultures, de manière économique et inoffensive pour l'environnement (Atamana et *al.*, 2008).

Il existe deux types de biopesticides sur le marché, en l'occurrence : les pesticides biochimiques qui sont des substances d'origine naturelle et/ou des molécules synthétiques qui leur ressemblent (Thakor, 2006) et les pesticides microbiens qui contiennent les

microorganismes bénéfiques, tels que les bactéries, les champignons, les levures, les virus, les protozoaires, comme matière active (Aitkaki, 2014).

Le triangle plante-*Trichoderma*-pathogène est un réseau complexe de nombreux processus. *Trichoderma* spp sont des symbiotes végétaux opportunistes avirulents. En plus d'être des organismes symbiotique végétaux performants, *Trichoderma* spp se comportent également comme un fongicide (coloniser l'entièreté de la plante en la protégeant des maladies fongiques) ou en tant que biostimulant (association symbiotique dans les plantes conduit à l'acquisition d'une résistance des plantes aux agents pathogènes, améliore les processus de développement, les rendements et favorise l'absorption de l'efficacité d'utilisation des nutriments et des engrais

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7355703/>).

L'objectif de notre étude est la recherche de la forme la plus efficace de l'agent antagoniste *Trichoderma* vis-à-vis du *Fusarium oxysporum*. Nous avons ciblé une souche appartenant au genre *Trichoderma*, suite à des travaux antécédents qui ont montré que les espèces de ce genre sont efficaces dans l'inhibition de la croissance des pathogènes.

Nous nous sommes intéressés à :

- la purification de la souche de *Trichoderma*
- la lyophilisation de la souche étudiée
- la formulation de *Trichoderma*
- l'évaluation de l'efficacité de cet antagoniste *Trichoderma* vis-à-vis à d'une espèce fongique pathogène appartenant à la famille des Nectriaceae, *Fusarium oxysporum* sp. *pisi* sous trois formes de *Trichoderma* sp : Etat frais, lyophilisé et formulé

CHAPITRE.I.
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Microorganismes et leurs applications en biotechnologie agricole

La recherche en microbiologie et en biotechnologie couvre un large éventail de sujets et d'applications qui exploitent les microorganismes dans le développement durable et la production des produits à valeur ajoutée (<https://inrs.ca/la-recherche/thematiques-de-recherche/microorganismes-et-biotechnologie/>).

Les biotechnologies peuvent être appliquées à tous types d'organismes et de microorganismes, depuis les virus et les bactéries jusqu'aux animaux et aux plantes. Ceci constitue un élément de grande importance pour la médecine, l'agriculture et l'industrie modernes(<https://www.greenfacts.org/fr/ogm/3-organismes-genetiquement-modifies/1-biotechnologie-agricole.htm>).

Dans la production et l'élaboration agricoles, les biotechnologies sont utilisées pour résoudre tous types de problèmes, pour augmenter le rendement de la culture, renforcer la résistance aux ravageurs, lutter contre les conditions difficiles, et également pour augmenter la teneur en nutriments de l'aliment.

De nos jours, il est connu que certaines bactéries, virus et champignons peuvent être utilisés comme agents de lutte biologique en phytoprotection.

Les bactéries sont les microorganismes les plus souvent associés aux insectes. Plus d'une centaine d'espèces bactériennes appartenant surtout à trois grandes familles qui sont les : *Bacillaceae*, *Enterobacteraceae* ; et *Pseudomonaceae*, ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique (Atamana et al., 2008).

C'est partant de leur capacité d'infecter tous les êtres vivants que les virus sont exploités comme agent de lutte biologique dans l'agriculture. En effet, certains virus ont été signalés avoir une capacité de réduire la pathogénicité de certains champignons phytopathogènes. Ce phénomène connu sous le nom d'hypovirulence est défini comme l'expression d'une virulence réduite d'un micro-organisme à la suite de la présence d'un virus (Muslim et al., 2003 ; Boland, 2004 ; Sharma et al., 2018). Par exemple virus *spodopteraexiguanucleopolyhedrosis* comme larvicide.

Outre les virus et les bactéries, plusieurs souches de champignons filamenteux sont utilisées dans la lutte biologique. Ces champignons figurent parmi les groupes des microorganismes les plus exploités pour lutter contre les perturbateurs des cycles biologiques des plantes tels que les nématodes, les bactéries, les champignons phytopathogènes et surtout

contre les insectes ravageurs (Baron et *al.*,2019).par exemple *Lecanicillium longisporum* comme Insecticide.

II. Les biopesticides

II.1. Définition de biopesticide :

Les biopesticides sont des substances biologiques et des agents antiparasitaires issus de sources naturelles comme des bactéries, des champignons, des virus, des plantes et des animaux. Aussi appelés pesticides biologiques, ils peuvent offrir une solution de rechange aux produits chimiques de synthèse utilisés pour lutter contre les populations de bioagresseurs dans les champs cultivés et d'autres environnements de production (<https://agriculture.canada.ca/fr/agriculture-environnement/lutte-antiparasitaire-agriculture/biopesticides>).

II.2. Les différentes catégories de biopesticides

Selon leur origine, les pesticides biologiques peuvent être catégorisés en biopesticides d'origine végétale, animale et microbienne (Deravel et *al.*,2014) .

A. Biopesticidesd'origine végétal

Certaines plantes sont connues et utilisées pour leurs activités biocides (toxiques) ou répulsives, vis-à-vis des bio agresseurs.

Ces plantes produisent des substances actives, qui sont le plus souvent des métabolites secondaires, ayant des propriétés insecticide, antifongiques, antibactériennes et autres, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes.

Ces substances sont obtenues à partir des différentes parties de la plante telles que les fleurs, les feuilles, les écorces, la sève, le bois, les racines, les gousses, les bulbes, les rhizomes, les fruits et les graines à l'état sec ou frais (Deravel et *al.*, 2014 ; Lengai et Muthomi, 2018 ; Werrie et *al.*, 2020).

Elles sont pris en considération comme biopesticides d'origine végétale, les extraits des plantes (frais et sec), les huiles essentielles, les huile végétales et aussi les plantes à pesticides intégrés PIPs (Deravel et *al.*, 2014 ; Lengai et Muthomi, 2018), qui sont des organismes modifiés par génie génétique, capables de produire et d'utiliser des substances pesticides afin de se protéger contre des insectes, des virus ou des champignons .

Les PIPs les plus connues sont des plants de pommes de terre, maïs et coton ayant la particularité de produire la protéine Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Deravel et *al.*, 2014).

B. Biopesticides d'origine animal

Les biopesticides d'origine animal sont des ennemis naturels comme les prédateurs ou les parasites, ou des molécules dérivées d'animaux, souvent d'invertébrés, d'abeilles, de scorpions, des hormones (Leng et *al.*, 2014).

Les biopesticides d'origines animale qui sont des signaux chimiques produits par un organisme et qui changent le comportement d'individus de la même espèce ou d'espèces différentes sont également répertoriés sous l'appellation «semio-chimique» (Deravel et *al.*, 2014).

Les substances les plus couramment utilisées sont des phéromones sexuelles d'insectes qui sont employées dans des mortel pièges de surveillance, des systèmes de leurre et de piège ou pour la perturbation de l'accouplement d'un ravageur ciblé (Deravel et *al.*, 2014 ; Lengai et Muthomi, 2018).

Les biopesticides d'origine animale ont un mode d'action varié passant par la prédation au parasitisme ou par injection des substances toxique causant la mort de l'insecte ravageur ou par des signaux chimiques créant la confusion chez ceux-ci ou stimulant un changement de comportement. Par exemple, la diffusion continue de phéromone de la tordeuse de la vigne désoriente les mâles et les femelles afin de brouiller le signal émis par la femelle et empêcher l'accouplement (Leng et *al.*, 2011 ; Deravel et *al.*, 2014 ; Senthil-Nathan, 2015 ; Lengai et Muthomi, 2018).

C. Biopesticides d'origine microbienne

Selon Jacques et *al.* (2014) les produits phytosanitaires à base des microorganismes représentent environ 30% des biopesticides et de nouveaux produits sont régulièrement mis sur le marché mondial.

L'usage des microorganismes dans la lutte biologique présente des nombreux avantages parmi lesquels une dissémination facile, une spécificité de leur action sur certains organismes cibles, une efficacité à des faibles doses d'administration initiale ainsi qu'une persistance et une ubiquité dans le pathosystème (Sellami et *al.*, 2015).

1. Les biopesticides bactériens**Exemple de *Bacillus thuringiensis* (Bt)**

La bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été le premier microorganisme homologué dans le monde comme biopesticides : les premières homologations datent des années 60 aux Etats-Unis des années 70 en France.

Si actuellement c'est le microorganisme le plus utilisé en lutte biologique, c'est que cette bactérie se multiplie facilement en fermenteurs, que les produits formulés se conservent bien, qu'ils sont très sélectifs et que les prix de revient sont compétitifs (chaufaux, 1995).

La principale caractéristique de Bt est de synthétiser pendant la phase stationnaire, une inclusion cristalline souvent appelées cristal, composée de protéine appelées δ -endotoxine ou protéine Cry dont la plupart possèdent une activité larvicide et un spectre d'action bien délimité.

2. Les biopesticides viraux

Exemple de *Baculovirus*

Les *Baculovirus*(Baculoviridae) sont des virus qui ont été développés pour être utilisés comme insecticides biologique pour le contrôle des ravageurs des forêts et des cultures agricoles (Moscardi, 1999), ou comme vecteurs d'expression dans des applications biotechnologique (kost et *al.*, 2005).

La spécificité d'espèce du virus est liée à sa capacité à accomplir un cycle complet dans les cellules de l'hôte parasité. Ces virus sont donc responsables de polyédroses nucléaires dans les cellules des insectes. Le virus protégé des facteurs de l'environnement par ce corps d'inclusion, est disséminé ainsi à la mort de l'insecte (Chamont, 2020).

3. Biopesticides d'origine fongique (mycopesticides)

Exemple de *Trichoderma*

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

Les champignons du genre *Trichoderma*, ont été mentionnées pour la première fois par Vuillemin en 1887(cité dans Lamy Krafft et Roquebert 1981), pour leurs propriétés antagonistes, utilisés comme agents de lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes. En 1971 Dennis et Webster ont pu élucider les différents mécanismes d'action de ce champignon antagonistes qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments et l'espace (Dennis et Webster, 1971).

Plus récemment, les travaux de Baker (1988) et deLynch et *al.* (1991) ont montré que certaines souches du *Trichoderma* semblaient exercer une action stimulatrice sur la croissance de certaines plantes.

3.1 Ecologie

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

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

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

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

3.2 Morphologie

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp (figure 1.A) est apprécié à partir de cultures sur gélose nutritive appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides (<https://agronomie.info/fr/le-genre-trichoderma/>).

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

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

Au microscope optique (figure 1.B) 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 (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek et *al.*, 2003)

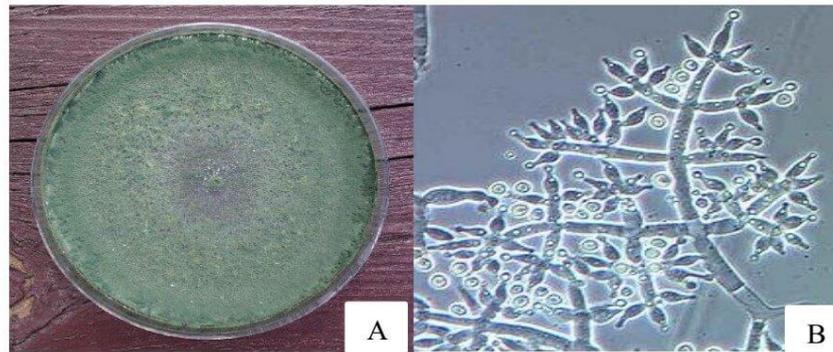


Figure 1. *Trichoderma harzianum* (<https://agronomie.info/fr/le-genre-trichoderma/>)

A: aspect macroscopique B : aspect microscopique

3.3 Taxonomie

La position actuelle des *Trichoderma* sp se présente comme suit (Bissett, 2004):

- Embranchement: Amastigomicota et/ou Eumycètes
- Sous embranchement : Ascomycotina
- Classe : Sordariomycètes
- Ordre : Hypocreales
- Famille : Hypocraceae
- Genre : *Trichoderma*

3.4. La reproduction

Pour la majorité des champignons de ce genre, les spores asexuées sont le moyen de reproduction. Vus au microscope, les hyphes, les conidiospores et les conidies peuvent être observés. Ici, les conidiophores situés à l'extrémité des hyphes hyalines sont responsables de la production de conidies (spores vertes) qui germent et se développent ensuite pour former de nouveaux champignons au fur et à mesure du cycle. Certaines espèces se sont avérées capables de se reproduire sexuellement (<https://agronomie.info/fr/le-genre-trichoderma/>).

3.5. Mode d'action

Trichoderma a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action (**figure 2**). Selon Caron (2002) il peut utiliser :

- L'antibiose qui résulte de la production des substances (métabolites secondaires) qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène.

- la compétition qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes mais *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables.
- le parasitisme qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque *Trichoderma* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent.

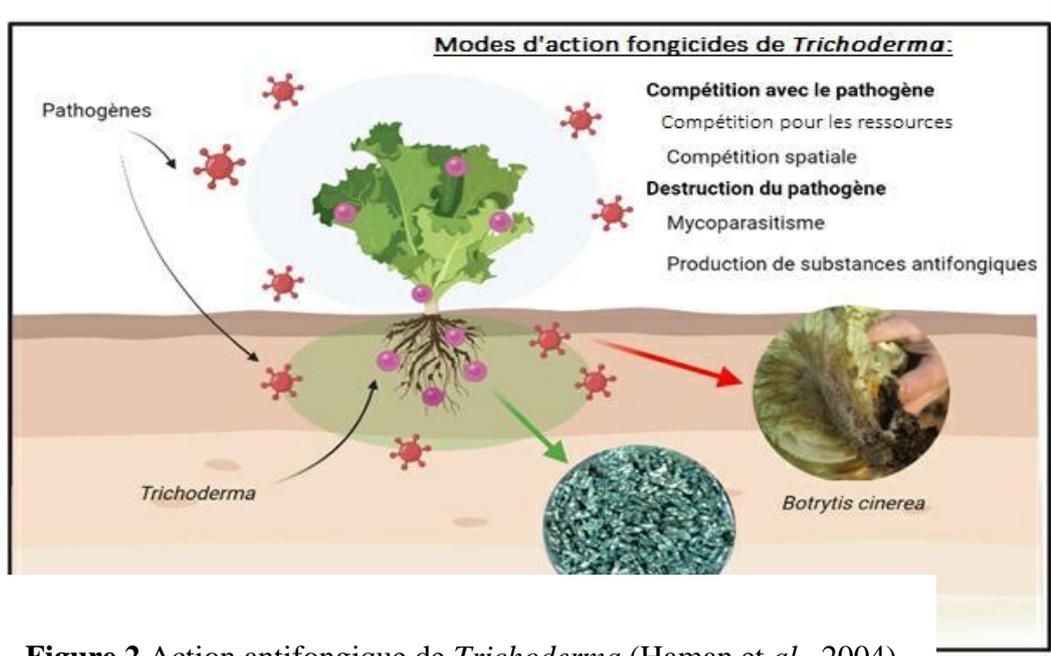


Figure 2. Action antifongique de *Trichoderma* (Haman et al., 2004).

Trichoderma possède une batterie de mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. Le déploiement des modes d'action varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc...). *Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive. Il permet au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines. Le même effet est observé lorsqu'il est utilisé en pulvérisation aérienne. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (Caron, 2002).

3.6. Stimulation de la croissance des plantes

Certaines souches de *Trichoderma* symbiotiques permettent également de stimuler la croissance des plantes. Cet effet a notamment été largement étudié sur maïs et les effets bénéfiques pour cette plante sont les suivants :

- Changements dans la composition microflorale des racines.
- Amélioration du prélèvement en nutriments dont l'azote.
- Amélioration de la solubilisation des nutriments du sol.
- Amélioration de la croissance racinaire.
- Stimulation du chevelu racinaire.
- Développement racinaire plus profond

Cette stimulation de la croissance est en partie due à une meilleure disponibilité des éléments nutritifs et notamment à l'aptitude de la souche à solubiliser le phosphate, le zinc, le manganèse, le fer et le cuivre (Girand, 2018).

II.3. Les exemples d'application des biopesticides

Des exemples de biopesticides commercialisés appartenant aux trois différentes catégories, sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Quelques biopesticides commercialisés (Chandler et al., 2011; Deravel et al., 2014).

	Catégorie	Organisme	Activité biologique	Cible	culture	
Microbienne	Bactérie	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Agent antibactérien	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Fruit mous ,noisette,vignes	
		<i>Xanthomonas campestris</i> sp. <i>Poannua</i>	Herbicide	<i>Herbe bleue annuelle</i>	Gazon	
		<i>Bacillus subtilis</i>	Fongicide	<i>Rhizoctonia, Fusarium, Aspergillus</i>	Soja ,arachide	
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fongicide	<i>Rhizoctonia, Fusarium</i>	Arbustes ,plantes ornementales	
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	Fongicide	<i>Tilletia caries, Fusarium nivale, Septoria nodorum</i>	Blé	
		<i>Bacillus thuringiensis</i>	Insecticide	<i>Chenille, Larves de lépidoptères</i>	Pelouse et jardin	
	Virus		<i>Bacillus thuringiensis</i>	Insecticide	lépidoptères	Vignes, arbres fruitiers ,maraichage
			<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	Insecticide	<i>Carpocapse</i>	Pommiers, poiriers
			<i>Helicoverpa zea</i> HzS NPV	Larvicide	<i>Heliothis et Helicoverpa</i> larvovae	maïs , cultures maraichères, coton , blé
	Champignon		Spodoptera exigua nucleopolyhedrosis virus	Larvicide	Larves de Spodoptera exigua	Pomme de terre, tabac , cultures maraichères , tournesol,ect.
			<i>Lecanicillium longisporum</i>	Insecticide	Pucerons	Culture sous serre , comestible et ornementales
			Phytophthora palmivora	Herbicide	Vigne étranglée	Agrumes

		<i>Trichoderma harzianum</i>	Fongicide	<i>Pythium, Phytophthora, Rhizoctonia</i>	Vergers, ornementales, culture en serre
		<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Nématicide	<i>Meloidogyne spp., Rodopholus similis, Heterodera spp., Globodera spp., Protylechus spp.</i>	Culture maraichères, bananiers
Végétaux	Extrait végétal	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Insecticide	<i>Pucerons, cochenilles, aleurodes</i>	Arbustes, plantation en serre, pépinières
		<i>Quassia amara</i>	Insecticide	<i>Hoplocampate studinea</i>	Pommiers
		<i>Azadirachta indica</i>	Insecticide	+400 espèces d'insectes ravageurs	Toutes cultures
		<i>Brassic napus</i>	Insecticide	Pucerons et acariens	Maraichage, arbres fruitiers, plantes ornementales
Biopesticides animaux	Insectes	<i>Acariens coccinelle</i>	Insecticide	Insectes, ravageurs	Culture sous abris
			Insecticide	Pucerons	Culture sous abris
	Sémiochimiques d'insectes	Phéromones naturelles de <i>Cydia pomonella</i>	Lutte par confusion sexuelle	<i>Cydia pomonella</i>	Vergers de pommiers, poiriers, noyers
	Nématodes	Nématodes entomopathogènes	Anti limace	<i>Deroceca reticulatum, Arion distinctus</i>	Légumes, fraises, plantes ornementales

II.4. Les avantages et les inconvénients de biopesticides

➤ Avantages

Les avantages potentiels de l'utilisation des biopesticides dans les programmes agricoles et de santé publique sont considérables. Les biopesticides n'ont pas de problème de résidus, ce qui est un sujet de préoccupation important pour les consommateurs (Kumar, 2012).

Selon Al alam (2017) l'intérêt des biopesticides repose sur les avantages associés aux :

- produits qui sont intrinsèquement moins nocifs et respectueux de l'environnement.
- souvent efficaces en très faible quantité.
- Naturellement et rapidement décomposables.
- Restreindre ou éliminer l'usage des produits chimiques nocifs.
- Diminuer les risques du développement de la résistance.
- Augmenter la spécificité d'action.
- Ne prévoir aucun délai avant la récolte.
- Favoriser la croissance des plantes par certains biopesticides microbiens.
- Maintenir la biodiversité des environnements.

➤ **Inconvénients**

Certains des avantages écologiques des biopesticides, comme leur faible rémanence ou le fait qu'un produit soit actif contre un faible spectre de nuisibles, peuvent être considérés comme des inconvénients (Deravel et *al.*, 2014).

-leur activité souvent dépendante des conditions climatiques et environnementales rendent

Lesbiopesticides moins efficaces que leurs homologues chimiques (Deravel et *al.*, 2014).

-Efficacité pas autant assurée sur tous les produits

(<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://isaranet.fr/webcourses/MOOC/res/Biopesticides.pdf&ved=2ahUKEwj-vuXxtZL5AhXqMewKHZo0B6oQFnoECC8QAQ&usg=AOvVaw0R1RWIvN1Sm4xX4ShfiRAE>).

-La réglementation n'autorise pas leur utilisation en agriculture biologique dans tous les pays du monde

(<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://isaranet.fr/webcourses/MOOC/res/Biopesticides.pdf&ved=2ahUKEwj-vuXxtZL5AhXqMewKHZo0B6oQFnoECC8QAQ&usg=AOvVaw0R1RWIvN1Sm4xX4ShfiRAE>).

II.5. Économie des biopesticides

Les biopesticides doivent être compétitifs sur le prix en plus de l'efficacité et de la cohérence. Souvent, le coût de la fermentation des microbes est plus élevé que le coût de fabrication d'un produit chimique synthétique, donc pour être compétitifs sur le marché, les

isolats microbiens doivent avoir une puissance élevée contre le ravageur ou une capacité de rendement élevée pendant la production (Glare, 2012).

Les entreprises évitent de développer des produits non rentables (Ravensberg, 2011), par exemple, lors du développement de Contans, la société Prophyta a pris en compte l'économie de la production de masse de spores au début du processus pour s'assurer que le produit serait commercialement viable (Eiben et *al.*, 2006). Des produits tels que ceux à base de Bt, Serenade et Contans sont en concurrence par les prix avec les pesticides de synthèse, démontrant que le coût de production n'est pas toujours un obstacle.

III. La formulation

III.1. Généralité

La formulation recouvre l'ensemble des savoir-faire nécessaires au développement et à la fabrication d'un produit commercial caractérisé par sa valeur d'usage et répondant à un cahier des charges préétabli (Jean-Marie et Gilbert, 1999).

Un produit formulé est obtenu par association et mélange de diverses matières premières d'origine synthétique ou naturelle parmi lesquelles on distingue généralement les matières actives qui remplissent la fonction principale recherchée et les auxiliaires de formulation (colorants, parfums, solvants, plastifiants, et conservateurs...) qui assurent les fonctions secondaires, facilitent la préparation ou la mise en œuvre du produit commercial, ou prolongent sa durée de vie (Jean-Marie et Gilbert, 1999).

Cette activité concerne notamment les produits cosmétiques, les produits pharmaceutiques, les parfums, les peintures, les matières plastiques, les produits phytosanitaires, les produits d'entretien, les produits de nettoyage, les adhésifs, les explosifs, et les produits agro-alimentaires (<https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Formulation.html>).

La compréhension des phénomènes mis en jeu et la réalisation des produits formulés nécessitent de faire appel à plusieurs disciplines dont la physico-chimie et en particulier l'étude des interactions intermoléculaires, la chimie analytique et le génie chimique (Vangelis et Françoise, 2018).

III.2. Les principaux additifs et adjuvants utilisés dans la formulation

la matière active ne peut pas être employée à elle seule, elle nécessite en plus des ingrédients diluants ou des adjuvants pour la rendre apte à une utilisation pratique et effective. Les adjuvants améliorent l'efficacité des propriétés chimiques spécifiques du pesticide,

améliorant ainsi l'effet de durée du produit sur l'organisme nuisible ou sur la mauvaise herbe. Il y a une grande diversité dans les différents types d'agent diluants et adjuvants (**Tableau 2**).

Tableau 2. Différents types d'adjuvants ou additifs utilisés dans la formulation des produits (Elleuch et *al.*, 2016).

Additifs ou adjuvants	Exemples	Fonctions	Références
Agents dispersants	Amylose; Silicate D'aluminium; Glycolate d'amidon desodium	Dispersion de la formulation	(Lisansky et <i>al.</i> , 1993 ;Prabakaran et <i>al.</i> , 2001)
Agents Surfactants et humidifiants	Éthoxylates (Tween) ;polyéthylène glycol	Amélioration de l'émulsification, de la dispersion, de l'étalement et du collage	(Lisansky et <i>al.</i> , 1993 ;Couch et Ignoffo, 1981)
Agents répandeurs et collants	Gélatine;Gommes;Mélasse;Lait écrémé; Gels de légumes;Huiles végétales; Cires;Polymères hydrosolubles	Adhérence des biopesticides sur le feuillage;protection contre de la pluie et de la diffusion	(Parekhet Vinci, 2000 ;Cross et Poloneko, 1996; Behle et <i>al.</i> , 1996, 1997; Farrar et Ridgway, 1995 ; Angus, 1954, 1959 ; Jankevica et Zarins, 1997 ; Tamez-

			Guerra <i>et al.</i> , 1999)
Agents contrôlant la dérive et l'évaporation/ Agents humectants	Polyacrylamides ; Polysaccharides ; Gommages ; Sorbitol ; Saccharose ; Mélasse ; Polyglycol ; Glycérol	Réduction de la dérive et de l'érosion des produits pulvérisés	(Behle <i>et al.</i> , 1996 ; Smirnov <i>et Valero</i> , 1983 ; Navon, 1993 ; Carr <i>et al.</i> , 1993 ; Morris <i>et al.</i> , 1994)
Agents épaississants	Hydroxyéthyle ; Celluloses ; Gommages ; Polysaccharides	Modification de la viscosité des préparations pulvérisées afin de réduire la dérive, en particulier pour les applications aériennes	(Morris <i>et al.</i> , 1994 ; Couch <i>et Ignoffo</i> , 1981 ; Angus, 1954)
Tampons	Phosphate de sodium ; Phosphate de potassium	Régulation du pH ; contrôle de l'état ionique dans la formulation ; amélioration de la dispersion et/ou de l'intégration des adjuvants dans la formulation	Prabakaran <i>et al.</i> , 2001 ; McMullan, 2000 ; Montermini <i>et al.</i> , 1993)
Agents anti-mousse	Diméthylpolysiloxane ; Silice ; Alcool ; Huiles	Réduction de la tension de surface ; éclatement des bulles d'air, affaiblissement de la structure en mousse	(Ejiofor <i>et Okafor</i> , 1991 ; Dunkle <i>et Shasha</i> , 1988)
Agents anti-UV	Rouge Congo ; Acide folique ; Lignine ; Mélasse ; Acide paminobenzoïque	Protection contre les effets nocifs de la lumière solaire en formant une couche protectrice sur	(Tamez-Guerra <i>et al.</i> , 1996 ; Behle <i>et al.</i> ,

	; Alkylphénols	lesformulations	1996,1997 ; Yang et <i>al.</i> , 1995 ; Smith et Herbig,1998 ; Leboet Detroit, 1996 ; Bohm et Friend, 1990 ;McGuire et <i>al.</i> , 1991)
Agentsphagostimulant	Farine de maïs;Saccharose; Germe deblé; Germe de maïs; Farine de soja; Caséine ;Huile ; Glutamate ;Mélasse	Stimulation de L'ingestion desformulations par lesinsectes cibles	(McGuire et <i>al.</i> , 1990,1991,1994 ; Shapiro et Vaughn, 1995 ; Munsonet <i>al.</i> , 1996 ; Alexanderet <i>al.</i> , 1992)
Agentssynergisants	Sorbitol;Acide sorbique;Phosphate de sodium;Stilbène; Tinopal;Silicate; Inhibiteurs de protéases, Acide oléique,Acide linoléique	Amélioration del'activité desformulations	(Bok et <i>al.</i> , 1998 ; TamezGuerra et <i>al.</i> ,2002 ; Berto et <i>al.</i> , 2002 ; Gaudet etPuritch,1989)
Agentsanti_micr	Acide sorbique;Acid	Suppression de	(Teera-

additifs	propionique ; violet de gentiane	la croissance des microorganismes, en conservant la pureté de la formulation	(Arunsi et al., 2003 ; Marshall, 1999)
Agents transporteurs	Alginate; Carraghénane; Tourbe, Acrylamide et Acrylate ; Terrediatomées	Aide à la livraison de la formulation à la cible	(Yardin et al., 2000 ; Vidyasekaran et Muthamilan, 1995 ; Levy, 1991a ; b ; 1998 ; Henderson et Jack, 1994 ; Puritch <i>et al.</i> , 1991)
Agents liants	Gommes; Mélasse; Résines	Liaison des particules ensemble en granules	(Ridgway et al., 1996 ; Teera Arunsi et al., 2003)
Agents desuspension	Sorbitol; Polysaccharides de soja; Glycolate d'amidon; Saccharose	Maintient de la formulation en suspension	(Dubois et al., 1993)
Agents attractants	Phéromones ; Cucurbitacine ; Alcaloïdes; Plastisol	Attraction des insectes cibles (ils agissent un appât)	(Losel et al., 1998 ; McKibben et al., 1994)

III.3. Formulation des biopesticides

Dans la grande majorité des cas, les ingrédients actifs des biopesticides sont formulés de la même manière que les pesticides de synthèse. Ceci est plus pratique pour les utilisateurs car cela leur permet d'utiliser le même équipement pour plusieurs traitements.

La base de la plupart des biopesticides ce sont des organismes vivants. Au cours des processus de formulation et de stockage, la viabilité de ces organismes doit être maintenue à des niveaux acceptables. Les organismes doivent sortir de leur état dormant pour être actifs au moment de l'application (Boyetenko, 1998). Les problèmes de formulation des produits biopesticides sont considérables et une compréhension fondamentale approfondie des processus causant la perte de viabilité est nécessaire pour de nouveaux progrès (Seaman, 1990; Boyetenko, 1998).

Le produit final est maintenu en mélangeant le composant bioactif avec différents supports et adjuvants pendant le processus de formulation pour une meilleure protection contre les facteurs environnementaux, des taux contrôlés, une bioactivité améliorée et une stabilité au stockage (Tijjani et *al.*, 2016).

III.4. Les fonctions de base de la formulation

La formulation a pour but de :

- stabiliser l'organisme pendant la distribution et le stockage.
- faciliter la manipulation et l'application du produit afin qu'il soit facilement livré à la cible de la manière la plus appropriée et formulaire.
- Protéger l'agent des facteurs environnementaux nocifs sur le site cible, augmentant ainsi la persévérance.
- Améliorer l'activité de l'organisme au site cible en augmentant son activité, reproduction, contact et interaction avec l'organisme nuisible ou pathogène cible (Varsha et Shahida, 2020).

Ces fonctions peuvent être réalisées en formulant des bioagents de différentes manières (Seaman, 1990 ; Mollet, 2001). En ce qui concerne leur état physique, les formulations de biopesticides peuvent être divisées en formulations liquides et sèches (Slavica et Brankica, 2013).

A. Formulation sèche :

Il existe plusieurs forme de formulation sèche :

- **Poudre de poussière (DP)**

La concentration en ingrédient actif dans les formulations en poussière est généralement 10 %, et l'ingrédient actif est produit par sorption du composant actif sur une poudre minérale solide finement broyée (talc, argile, etc...) avec des tailles de particules

allant de 50 à 100 mm (Tijjani et *al.*, 2016). Les poussières peuvent être appliquées soit mécaniquement ou manuellement sur la cible. Les ingrédients inertes pour cette formulation sont des agents anti-agglomérants, des protecteurs ultraviolets et des matériaux adhésifs pour améliorer l'adsorption. Ils ont des effets bénéfiques dans certaines situations, mais ils offrent également un risque d'inhalation majeure pour les utilisateurs. Il s'agit d'un ancien type de formulation qui a été utilisé pendant de nombreuses années avant l'invention des granulés et il a finalement été interdit en raison de leurs impacts néfastes sur la santé des utilisateurs (Slavica et Brankica, 2013).

D'autres poussières sont fabriquées d'une manière très simple et sont encore utilisées dans de nombreuses régions du monde aujourd'hui (Knowles, 2001).

- **Les granules (GR)**

Sont des particules granulaires qui sont plus grosses et plus lourdes que les particules de poussière. Les matériaux minéraux (kaolin, attapulgite, silice, amidon, polymères, engrais secs et résidus de plantes broyées) sont utilisés pour faire des particules grossières (de taille 100-1000 microns pour les granules et 100-600 microns pour les microgranulés) (Tadros, 2005).

La concentration d'ingrédients actifs pour les granulés varie de 2 à 20 % et les ingrédients actifs recouvrent l'extérieur du granulé ou sont absorbés dans les granulés. Les produits en granulés sont fabriqués en mélangeant un mélange de poudre avec une petite quantité d'eau pour former une pâte, qui est ensuite extrudée et séchée si nécessaire. Une autre méthode de production consiste à appliquer un ingrédient actif liquide sur un matériau absorbant grossier. Après cela, les granulés peuvent être enrobés de résines ou de polymères pour contrôler le taux d'efficacité de l'ingrédient actif après application.

Les biopesticides granulaires sont les plus couramment utilisés pour appliquer des éléments sur le sol afin de générer les mauvaises herbes, les nématodes et les insectes qui y vivent pour l'absorption par les racines des plantes. Certains granulés libèrent leurs principes actifs après exposition à l'humidité du sol (Knowles, 2005 ; Lyn, 2010).

- **Enrobage de semences (SD)**

Est un type de formulation de biopesticide fait en combinant une poudre de support de composant actif avec un inerte pour faciliter l'adhérence du produit final aux téguments (Slavica et Brankica, 2013).

Les poudres pour l'enrobage des semences sont appliquées sur les semences en faisant les culbuter avec le produit conçu pour y adhérer et elles contiennent également des agents colorants informant du pigment rouge comme marqueur de sécurité pour les semences traitées (Woods, 2003).

- **Poudres Mouillables (WP)**

Ce sont également des formulations sèches broyées finement et appliquées après suspension dans l'eau. Les poudres mouillables sont obtenues en mélangeant des ingrédients actifs avec des agents fondants et dispersants, un synergiste, des tensioactifs et des charges inertes. Des mesures de sécurité strictes sont généralement prises en raison de leur poussière qui peut causer de graves problèmes de santé aux fabricants lors de l'application (Tijjani et al.,2016). Pour ces raisons les poudres mouillables sont progressivement supprimées et remplacées par des concentrés en suspension ou des granulés dispersibles dans l'eau, qui ont été les formulations pesticides les plus largement utilisées (Knowles, 2005).

En outre, les WP ont une longue stabilité pendant le stockage, une bonne miscibilité avec l'eau et peuvent être appliqués avec des équipements de pulvérisation conventionnels (Brar et al., 2006 ; Knowles, 2008).

- **Granulés dispersibles dans l'eau (WDG)**

Granulés dispersibles dans l'eau sont conçus pour être suspendu dans l'eau et pour surmonter les problèmes associés aux WP (Knowles, 2008 ; Slavica et Brankica, 2013).

Ils peuvent être formulés à l'aide de diverses techniques de traitement, telles que la granulation par extrusion, la granulation en lit fluidisé, le séchage par pulvérisation, etc. Les produits contiennent un agent mouillant et un agent dispersant similaires à ceux utilisés dans les poudres mouillables, mais l'agent dispersant est généralement à une concentration plus élevée (Slavica et Brankica,2013). Les granulés dispersibles dans l'eau sont généralement plus chers que les anciens types de formulations (poussières, poudres mouillables), mais leur sécurité et leur plus grande commodité d'application les rendent toujours souhaitables pour de nombreux utilisateurs (Knowles, 2008).

B. Formulation liquide

- **Émulsion**

Les émulsions sont constituées de gouttelettes de liquide dispersées dans un autre liquide non miscible (la taille des gouttelettes en phase dispersée varie de 0,1 à 10 µm). L'émulsion peut être huile dans l'eau (EW), qui est une émulsion normale, ou eau dans l'huile

(EO), une émulsion inverse (Slavica et Brankica, 2013). Plus important encore, le choix approprié des émulsifiants pour la stabilisation afin d'éviter l'instabilité est nécessaire (Tijjani et *al.*, 2016).

Dans le cas des émulsions inverses, les pertes dues à l'évaporation et à la dérive de pulvérisation sont minimales car l'huile est la phase externe de la formulation (Brar, 2006).

- **Suspo-Émulsion (SE)**

Les suspo-émulsions peuvent être considérées comme un mélange de suspension concentrée et d'émulsion. Le produit est très exigeant à formuler car il est nécessaire de développer un composant d'émulsion homogène avec un composant de suspension de particules afin que le produit final reste stable (Tijjani et *al.*, 2016).

Une sélection soignée d'agents dispersants et émulsifiants appropriés est nécessaire pour surmonter le problème d'hétérofloculation entre les particules solides et les gouttelettes d'huile. De plus, des tests approfondis de stabilité au stockage de cette formulation sont nécessaires (Knowles, 2008). Malgré la complexité de cette formulation, l'utilisation et l'importance des suspo-émulsions ont été remarquables et continueront à augmenter (Slavica et Brankica, 2013).

- **Suspension concentrée (SC)**

Formulé en mélangeant un ingrédient actif solide finement broyé dispersé en phase liquide, généralement de l'eau. L'agitation est toujours une condition préalable à l'application pour maintenir les particules uniformément réparties car les particules solides ne sont pas dissoutes en phase liquide (Tijjani et *al.*, 2016).

La composition de la suspension concentrée est complexe et elle contient des agents mouillants/dispersants, des agents épaississants, des agents antimousse, etc. pour assurer une stabilité requise. Ils sont produits par un procédé de broyage humide et ont une distribution granulométrique allant de 1 à 10 μm . Pendant le processus de broyage, des ingrédients inertes adsorbés sur les surfaces des particules empêchent la réaggrégation des petites particules.

Ces petites particules permettent aux ingrédients actifs d'atteindre plus facilement les tissus végétaux et améliorant ainsi la bioefficacité (Slavica et Brankica, 2013).

- **Dispersion d'huile (DO)**

Les dispersions huileuses sont des dispersions de principes actifs solides dans un liquide non aqueux destinées à être diluées avant utilisation. Le liquide non aqueux est le plus

souvent une huile, le meilleur choix est une sorte d'huile végétale. De cette manière, la rétention, l'étalement et la pénétration peuvent être améliorés (Slavica et Brankica, 2013).

La dispersion d'huile fournit plusieurs caractéristiques importantes, telles que :

-la capacité à délivrer des ingrédients actifs sensibles à l'eau .

-capacité à utiliser un fluide adjuvant au lieu de l'eau, ce qui peut augmenter et élargir la lutte antiparasitaire.

Cette formulation est produit de la même manière que le concentré de suspension. Les problèmes d'instabilité pourraient être évités par une sélection appropriée d'ingrédients inertes (Vernner, 2007).

- **Capsule suspension (CS)**

Les ingrédients actifs sont formulés dans une suspension stable micro en capsulée destinée à être diluée avec de l'eau avant utilisation.

Le bio-agent en tant que principe actif est encapsulé dans des capsules (enrobage) faites de gélatine, d'amidon, de cellulose et d'autres polymères. De cette manière, le bio-agent est protégé des conditions environnementales extrêmes (rayonnement UV, pluie, température, etc.) et sa stabilité résiduelle est améliorée grâce à une libération lente (contrôlée). Le principe de polymérisation interfaciale est la méthode d'encapsulation la plus fréquemment appliquée et utilisée pour donner des formulations de plus petite taille et une efficacité élevée aux formulations de biopesticides fongiques (Winder et al, 2005).

Les suspensions de microcapsules doivent être stabilisées à l'aide de tensioactifs et d'épaississants de la même manière que la concentration en suspension et des additifs similaires sont utilisés.

Malgré les avantages évidents de cette formulation à libération contrôlée, son développement commercial est plutôt lent. La lenteur des progrès est due en partie à la complexité de la formulation et en partie à son coût de production élevé (El-Sayed, 2005 ; Chen, 2013).

- **Les liquides à ultra faible volume (ULV)**

Sont des concentrés de produits chimiques actifs qui ne sont pas conçus pour être dilués dans l'eau avant utilisation et il contiennent souvent des agents tensioactifs et des additifs anti-dérive (Slavica et Brankica, 2013).

Il est facile à transporter et peut être formulé en utilisant un agent de lutte biologique en suspension comme ingrédient actif (Woods, 2003).

II.5. Techniques et Méthode d'application des biopesticides

Une lutte antiparasitaire efficace peut être obtenue en utilisant les bonnes techniques/méthodes d'application et en appliquant les biopesticides au bon moment et/ou à la bonne fréquence (Tijjani et *al.*, 2016).

Parmi les méthodes d'application des biopesticides :

- **Trempage des semis**

Avant la transplantation, les racines des plantules sont trempées dans une suspension de biopesticide pendant quelques minutes ou quelques heures. Par exemple, *Trichoderma* sp sont utilisés de cette façon.

- **Application foliaire**

Signifie simplement pulvériser des biopesticides à la surface des feuilles. Par exemple, l'application de *B. subtilis* sur les feuilles d'haricot a réduit l'incidence de la rouille du haricot causée par *Uromyces phaseoli*.

- **Traitement des semences**

Le traitement des semences est la méthode ou la technique la plus efficace pour appliquer des biopesticides. Les formulations en poudre sont appliquées sur les graines en culbutant les graines avec le produit conçu pour adhérer aux graines (Matthew et *al.*, 2014 ; Wood , 2003).

CHAPITRE.II.

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau de deux laboratoires de PFE, le premier au sein du département des Biotechnologies et Agro écologie et le deuxième au niveau de département des génie des procédés de l'Université de Blida1. L'intérêt de cette étude s'est porté sur la formulation d'un microorganisme *Trichoderma* sp qui à prouver ces capacités dans la bio stimulation de la croissance des végétaux et dans le bio contrôledes bio agresseurs qui les menacent.

Notre étude est constituée de trois parties :

- ✓ La première partie comprend un essai *in vitro* qui détermine l'activité antagoniste de *Trichoderma* sp à l'état frais vis-à-vis un agent pathogène de la fusariose.
- ✓ La deuxième partie est consacrée à la lyophilisation et la formulation de la souche étudiée
- ✓ La troisième partie est consacrée a l'évaluation du pouvoir antifongique de *Trichoderma* sp lyophilisé et en poudre (formulé).

I. Matériel

I.1. Matériels non biologiques

Le matériel non biologique représenté par, la verrerie, l'appareillage (Annexe 1).

I.2. Matériels biologiques

Le matériel biologique est constitué d'un matériel fongique :

I.2.1 Matériel fongique

• *Souche antagoniste*

Une souche de *Trichoderma* sp (TAF2018) fournies par le laboratoire de mycologie (Université Blida , Algérie), Nous avons testé une espèce fongique qui a été identifié a travers une caractérisation morphologiques et culturelles et une analyse moléculaire en utilisant des amorces universels : Internal Transcribed spacer (ITS 1 et α TF) (**Tableau.3**)

• *Souche pathogène*

Une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (r2f42) fournies par l'institut de l'Agriculture Durable de cordoue Espagne (l'ias-csic) sont utilisées dans les inoculations fongiques.(**Tableau.3**)

Tableau 3. Caractéristiques des souches fongiques

Espèces	Hôte	Identification	Provenance
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisii</i>	POIS	Souche de référence (Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Pullman, USA)	l'ias-csic (cordoue, espagne)
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Citrus</i> sp	Ammad et al (2015)	Locale

I.3. Milieux de culture

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar), ce milieu est jugé comme milieux standard : dont leur composition a indiqué dans l'Annexe 2.

II. Méthode

II.1. Purification des champignons

La purification de ce champignon pathogènes et antagoniste a été réalisée après plusieurs repiquages par des transplantations successives des disques mycéliens des isolats testés sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA), L'incubation des cultures fongiques a été effectuée à une température de 25°C pendant 7 jours (Annexe 3).

II.2. Lyophilisation

La souche fongique antagonistes étudiée, productrices de quelques métabolites secondaires à été lyophilisée à des fins de conservation (pour le contrôle de la viabilité de notre souche après un mois), au niveau de laboratoire de l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Constantine, Algérie.

La technique consiste à Ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée de froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux (De Beer et al., 2006). Cette technique permet de conserver à la fois le volume et l'aspect du produit traité.

II.3. Formulation sèche de l'agent antagoniste *Trichoderma* sp (poudre mouillable)

Pour avoir une formulation en poudre mouillable, le Bentonite brut a été utilisé comme un support pour l'adsorption de l'agent antagoniste. Elle est utilisée comme agent de liaison, d'étanchéité et de lubrification dans une grande variété d'applications industrielles.

5 g du lyophilisat ont été mélangé dans 50 ml d'eau distillée stérile et 50 g de Bentonite brut ont été mélangé 140 ml d'eau distillée stérile, puis les deux mélanges ont été passés par une sonication pendant 10 minutes.

Les deux solutions de lyophilisat et Bentonite ont été ensuite mélangées. Après 2h d'agitation, le mélange a été réparti dans boîtes et laisser à une température ambiante pour le séchage jusqu'à l'obtention du produit final sous forme de poudre mouillable après suspension dans l'eau.

II.4. Activité antagoniste in vitro

L'action antagoniste de *Trichoderma* sp à l'état frais sur la croissance mycélienne des pathogènes est réalisé selon deux méthodes :

- Une confrontation directe
- Une confrontation indirecte (à distance) à travers la production des substances volatiles

A. Confrontation par contact direct sur milieu de culture

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

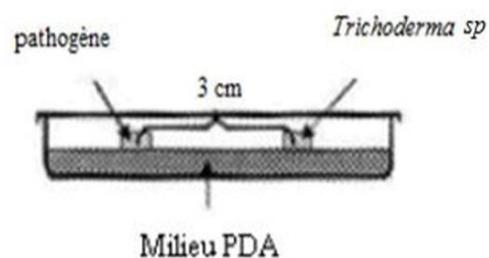


Figure3.Schéma montrant la confrontation à équidistance du

L'agent pathogène et de *Trichoderma* sp sur milieu PDA.

Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes sont par la suite incubées à l'obscurité (25°C) pendant six jours, avant la lecture des résultats qui consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste au bout de 6 jours après l'inoculation et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement (**Annexe 4**).

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

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

Témoin X 100

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

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

B. Confrontation à distance

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

A partir des cultures âgées de 7 jours, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre a été prélevée de chaque culture et placée séparément au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (**Fig.4**). Après l'enlèvement des couvercles aseptiquement, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Trichoderma* en bas et le pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par du para film pour éviter les pertes en substances volatiles. Trois répétitions sont réalisées.

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

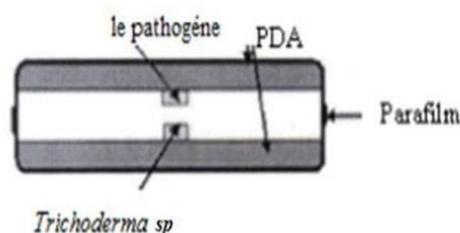


Figure 4. Schéma montrant la confrontation à distance.

II.5. Activité antagoniste in vitro de *Trichoderma* lyophilisé et formulé

Dans ce test nous avons utilisé une seule méthode de traitement (confrontation directe), vu la quantité insuffisante du *Trichoderma* lyophilisé et formulé, un co-ensemencement dans une même boîte de Pétri contenant un milieu PDA une pastille de

l'agent pathogène âgée de 7 jours (6 mm de diamètre) a été déposée à 3 cm de distance, dans trois boîtes de pétri un saupoudrage de la lyophilisat a été appliqué et dans autres trois boîtes la poudre mouillable a été appliquée une de l'autre et à équidistance du centre de la boîte prélevée à partir de cultures de *Trichoderma* et l'agent pathogène (âgées de 7 jours).

Toutes les boîtes sont par la suite incubées à l'obscurité (25°C) pendant six jours, avant la lecture de résultats qui consiste à mesurer le pourcentage d'inhibition selon la formule citée en haut. (**Annexe 5**).

CHAPITRE.III.

Résultats et Discussion

I. Caractérisation phénotypique des souches fongiques étudiés

La révérification de la souche antagoniste

Après incubation à 28 c pendant 7 jours la souche fongique antagoniste sur milieu PDA, nous avons constaté l'apparition d'une culture distincte visible à l'oeil nu présentant le critère macromorphologique spécifique du genre *Trichoderma*.

La révérification de la souche de pathogène

Après incubation à 28 c pendant 7 jours la souche fongique pathogène sur milieu PDA, nous avons constaté l'apparition d'une culture distincte visible à l'œil nu présentant le critère macromorphologique spécifique du genre *Fusarium*.

I.1. Etude macroscopique de *Trichoderma*

La souche de *Trichoderma* est caractérisée par une croissance rapide sur milieu PDA, elle a poussé sous forme des cercles concentriques réguliers, les colonies sont compactées en touffe. Un mycélium aérien, blanc se forme d'un cercle, très abondant, vigoureux, épais et dense, *Trichoderma* sp

Trois jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium.

D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite (**Fig.5.A**).

- **Caractérisation microscopique :**

Nous avons observé un mycélium composé d'hyphes septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés et ils portent des phialides et ces derniers portent des conidies (**Fig. 5. B, C, D, E**).

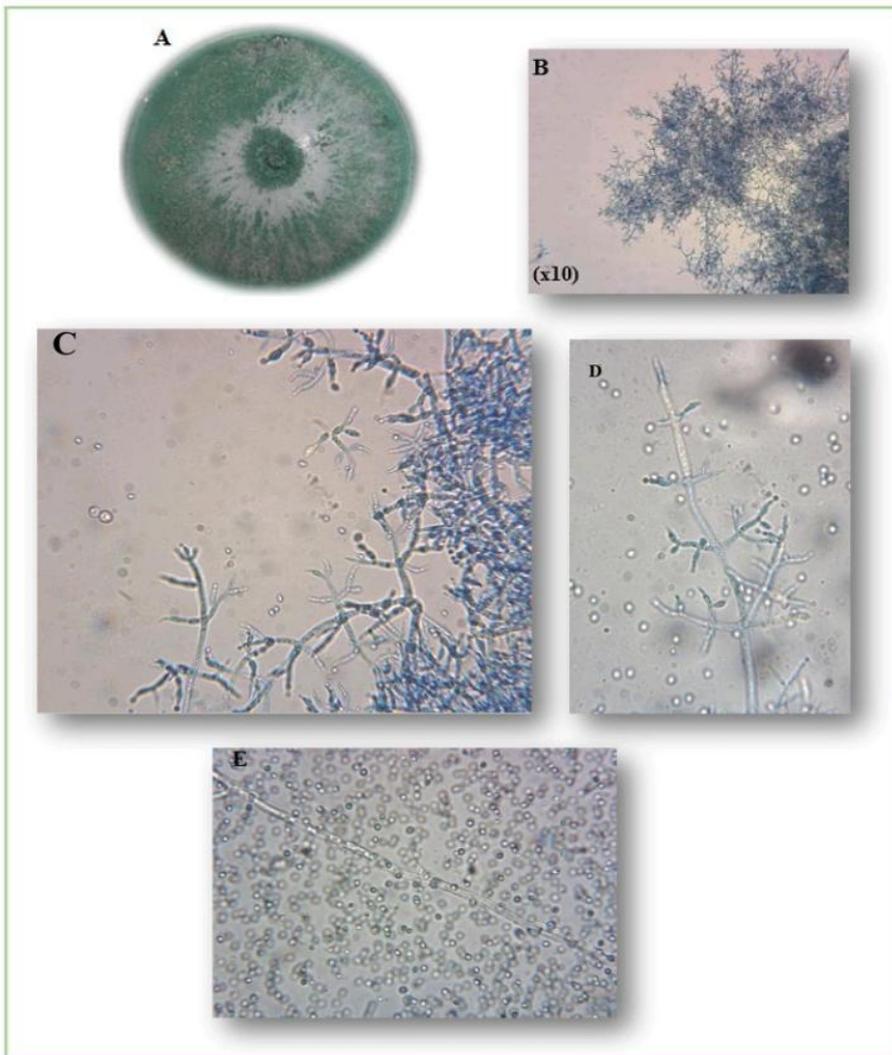


Figure 5. Aspect macroscopique (A) et microscopique (B,C,D,E) de *Trichoderma* sp.

C : phialides contenant des phialospores

D : conidiophore

E : spores

I.2. Etude macroscopique de *Fusarium*

Le mycélium aérien est cotonneux, les colonies présentent une couleur pourpre, au recto et au verso de la gélose.



Figure 6. Aspect macroscopique de l'agent phtyopathogène.

II. Aspect de l'agent antagoniste après lyophilisation et la formulation

Après une lyophilisation de 90 boîtes Pétri contenant des cultures de l'agent antagoniste *Trichoderma* sp, suivis par une formulation sèche. Nous avons obtenu une poudre de couleur verdâtre que ce soit à l'état lyophilisé ou formulé.



Figure 7. Lyophilisat de *Trichoderma* sp.



Figure 8. *Trichoderma* sp formulé.

III. Résultat du Pouvoir antagoniste de *Trichoderma sp* à l'état frais vis-à-vis de l'agent phytopathogène in vitro

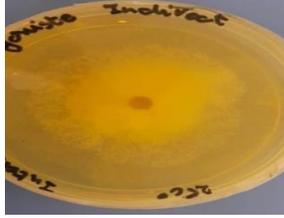
III.1. Confrontation directe sur milieu

Le pouvoir antagoniste de la souche de *Trichoderma* a été testé par la méthode ; confrontation directe par l'inhibition de la croissance mycelienne de la souche fongique de *Fusarium*, Le resultat montre que *Trichoderma* à l'état frais a inhibé la croissance mycelienne de la souche pathogène : *Fusarium oxysporum* testée. Au terme de 7 jours d'incubation à 28°C , un pourcentage d'inhibition de 73% . A été enregistré (tableau 4)

III.2. Confrontation à distance

Cette technique nous a permis d'enregistré un pourcentage d'inhibition de 46,15% de la croissance mycélienne de *Fusarium*, Par rapport au témoin ou nous avons enregistré une bonne croissance mycélienne. Au bout de 6 jours de confrontation à distance, nous avons observé des faibles réductions du diamètre des colonies d'agent fongique testé par rapport au témoin (non traité).

Tableau 4. L'effet inhibiteur de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne de souche pathogène (confrontation directe et indirecte) après 7 jours d'incubation.

Isolats fongiques	Témoin	Résultats du test d'antagonisme	Pourcentage d'inhibition
<i>Fusarium sp</i>			73%
<i>Fusarium sp</i>			46,15%

IV. Résultat du Pouvoir antagoniste de *Trichoderma* sp lyophilisé et formulé vis-à-vis de l'agent phytopathogène in vitro

IV.1. Confrontation directe sur milieu de culture

Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* sp à l'état lyophilisé et formulé vis-à-vis de l'agent phytopathogène *Fusarium* a été testé. Les résultats obtenus (Fig.9),(Fig.10) montrent que la croissance mycélienne de *Fusarium* souche témoin est très importante en comparaison avec les cultures traitées par le lyophilisat et le formulat de *Trichoderma*. Après 7 jours d'incubation à 28 °C, une action inhibitrice a été observée avec un pourcentage de 76,92% et 100% respectivement.

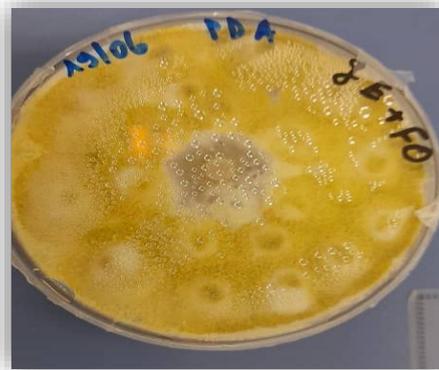


Figure 9. L'effet inhibitrice de l'agent antagoniste lyophilisé sur l'agent phytopathogène.



Figure10. L'effet inhibitrice de l'agent antagoniste formulé sur l'agent phytopathogène.

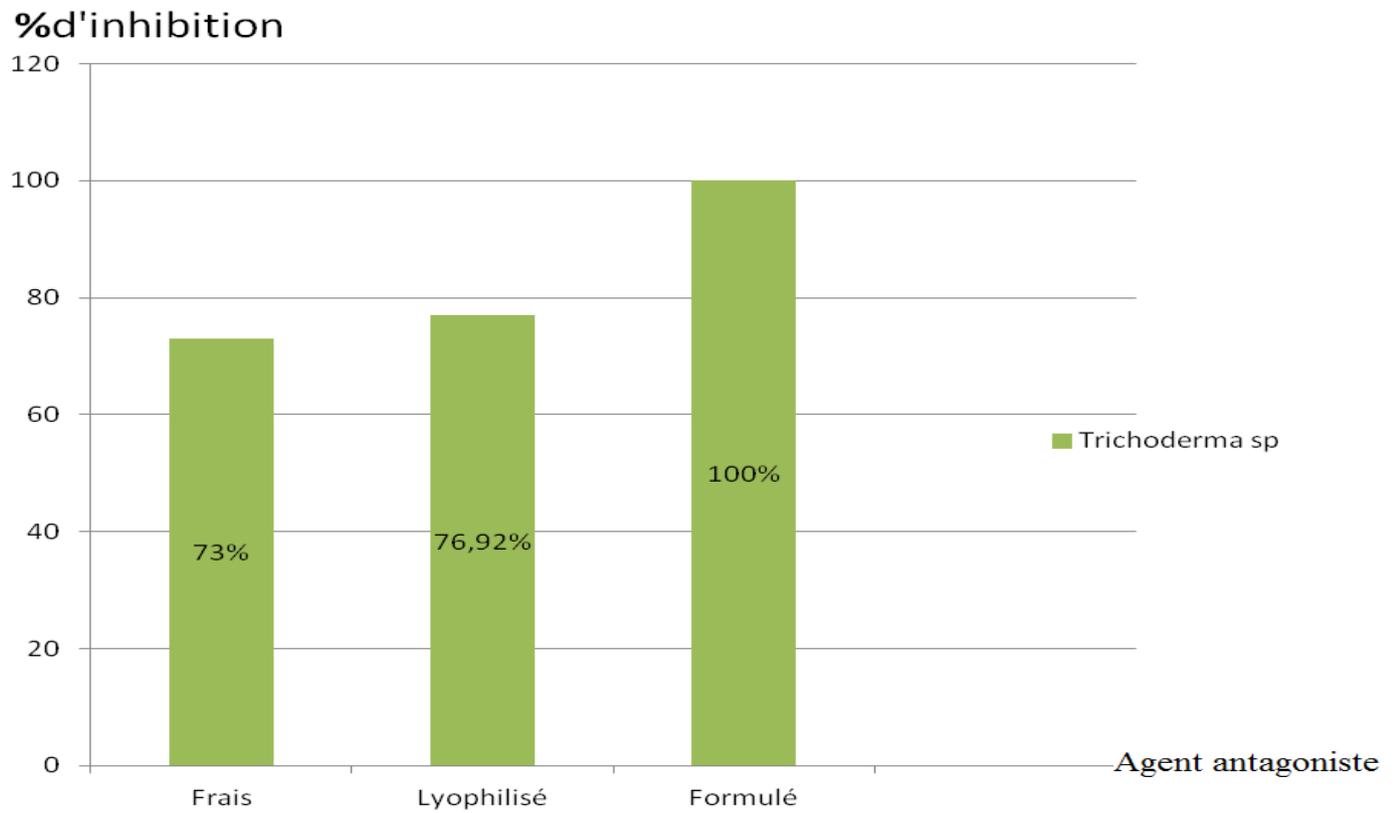


Figure 11. Pourcentage d'inhibition de mycélium de pathogène par le *Trichoderma* à l'état frais, lyophilisé, formulé.

Discussion générale

Dans cette étude *Trichoderma* a inhibé la croissance mycélienne du pathogène étudié, *Fusarium*, en formant une barrière qui empêche son développement.

La confrontation directe entre les différentes formes état frais, lyophilisé, et formulé de la souche de *Trichoderma* sp. Et l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* a mis en évidence des réductions significatives de la croissance du *Fusarium oxysporum* par rapport au témoin. Le pourcentage de réduction le plus élevé est obtenu avec la souche de *Trichoderma* formulé (100%). Ainsi, un pourcentage de 76,92% est obtenu avec *Trichoderma* lyophilisé et un pourcentage qui varie selon le type de confrontation a été enregistré avec la souche de *Trichoderma* à l'état frais, pour la confrontation directe nous avons noté 73%, et pour la confrontation indirect nous avons noté 46,15%.

Il est à noter que l'efficacité des trois formes de la souche de *Trichoderma* a montré un résultat très appréciable,

- Dans le cas de confrontation directe par la souche *Trichoderma* à l'état frais, La croissance de *Trichoderma* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition comme il a été cité dans les travaux de (Dubot, 1985. Davet, 1996). En 1988 Zhihe et al., ont prouvé que *Trichoderma* produit des substances qui inhibent la croissance des agents phytopathogènes.
- D'après les résultats de confrontation à distance *Trichoderma* a la capacité de produire des substances volatiles qui sont capable de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène (Hibar et al., 2005). Cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par la souche de *Trichoderma*. Dennis et Webstres (1971) ont montré que *Trichoderma* émette des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine sous forme de substance volatiles importantes.

In vitro, le pouvoir d'inhibition de la souche de *Trichoderma* formulé en poudre mouillable sur *Fusarium* est très élevé : 100%, notre hypothèse se repose sur :

- La production de métabolites secondaires

- La production d'enzymes capables de dégrader les parois cellulaires du champignon pathogène (chitinases, protéases)
- La compétition spatiale et nutritive exercée par *Trichoderma* sur *Fusarium*.

Dans la littérature les auteurs ont soulevé à travers les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact ont révélé l'existence d'altération au niveau du mycélium du *Fusarium oxysporum*, se traduisant par une lyse, une transformation des filaments mycéliens en cordons et un enroulement du mycélium de *Trichoderma* spp. autour de celui du *Fusarium oxysporum*. Une constatation comparable est observée par Hibar et al. (2005) avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis et Schoemoù *T. harzianum* s'est montré capable de s'enrouler autour du mycélium du pathogène, de provoquer une lyse importante du mycélium, et une transformation des filaments mycéliens en cordons. Lu et al. (2004) ont observé ces mêmes types d'enroulements du mycélium de *T. atroviride* autour du mycélium de *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum* Trow, dans des confrontations directes *in vitro*. Aussi, des ramifications excessives du mycélium de *T. atroviride* qui apparaissent être une réponse active à la présence de l'agent pathogène, sont également observées. Dans le même sens, Elad et al. (1982) avaient signalé l'enroulement du mycélium de *T. hamatum* (Bon.) Bain sur celui de *R. solani* avec une dégradation partielle de ce dernier. Ils ont aussi observé une lyse du mycélium de *Sclerotium rolfsii* Saccen présence de *T. harzianum*. Des résultats similaires sont obtenus par Cherif et al. (1996) avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en présence de *Trichoderma* spp., où des zones de lyses et de dégradation des conidies et du mycélium du pathogène avec des enroulements d'hyphes sont observés. Ils ont observé également que les hyphes perdent leur turgescence et deviennent transparents, indiquant une perte du contenu cellulaire. De même, Howell (2003) a signalé que *T. lignorum* (Tode) Harzétait capable de s'enrouler sur le mycélium de *R. solani* causant une dissolution du cytoplasme du pathogène.

Dans la confrontation indirecte, caractérisé par une absence de contact direct entre l'agent antagoniste et le *Fusarium oxysporum*, les *Trichoderma* spp. agissent seulement par la production de substances antifongiques volatiles. Une réduction significative de la croissance mycelienne du pathogène par rapport au témoin est notée. Les taux de réduction les plus importants sont notés avec les trois formes de *Trichoderma* : formulé, lyophilisé et à l'état frais. Selon Dodd et al. (2003), Samuels et al. (2002), une odeur de noix de coco est présente sur le milieu de culture PDA, cette odeur est caractéristique de l'antifongique volatil 6-pentyl- α -pyroneren contré uniquement chez l'espèce *T. atroviride* et *T. viride* de la section

Trichoderma. Oliver et Germain (1983) ont également rapporté la production d'antibiotiques volatils chez des isolats appartenant à l'espèce *T. harzianum*.

Les résultats de biocontrôle confirment que l'agent antagoniste, même après lyophilisation et formulation, a gardé son viabilité et la même efficacité contre l'agent pathogène. Le succès de l'agent de lutte biologique fongique *Trichoderma* dans la gestion des maladies des plantes dépend non seulement de ses propagules et mécanismes de lutte biologique très efficaces, mais également de ses systèmes de formulation et de délivrance en relation avec la culture, la maladie et l'environnement. Deux grands types de formulation sont couramment utilisés : la formulation solide et la formulation liquide. Pour prolonger la durée de conservation et améliorer l'efficacité de l'application de *Trichoderma*, la microencapsulation a été développée. Les modes d'administration et d'application de *Trichoderma* se concentrent sur le traitement des semences en utilisant des techniques de technologie des semences telles que l'amorçage à matrice solide, l'enrobage liquide et le double enrobage. Le développement de systèmes de contrôle biologique dans la formulation de *Trichoderma* est essentiel pour promouvoir une gestion durable des maladies des plantes. La durée de conservation du produit formulé d'un agent de lutte biologique joue un rôle important dans le succès du marketing. En général, les antagonistes se multiplient dans un aliment bio a une durée de conservation plus longue que les aliments inertes ou inorganiques bases. La durée de conservation de *Trichoderma* dans la coque de café était plus de 18 mois. À base de talc, de tourbe, de lignite et de kaolin formulation de *Trichoderma*, ont une durée de conservation de 3 à 4 mois. Les propagules viables de *Trichoderma* dans le talc formulation ont été réduites de 50 % après 120 jours de stockage (Sankar et Jeyarajan, 1996). Des études sur le stockage de la formulation de *T. viride* dans des sacs en polypropylène de différentes couleurs ont révélé que la population de *T. viride* était maximale dans des sacs blanc laiteux de 100 microns épaisseur. Au PDBC, Bangalore travaille sur l'augmentation de l'étagère durée de vie des formulations de talc de *Trichoderma* utilisant divers ingrédients (chitine et glycérol) dans le milieu de production et choc thermique en fin de phase logarithmique de fermentation a été réalisée ce qui peut allonger la durée de conservation du talc formulation de succès jusqu'à un an (Sriram et al.,2010, 2011). Bhat et al. (2009) ont rapporté la durée de conservation du talc formulation à base jusqu'à 180 jours.

Conclusion

La pratique la plus fiable pour lutter contre les agents phytopathogènes et en baissant l'emploi de produits chimiques et le risques qui atteignent l'homme et son environnement est la lutte biologique. Car elle permet une protection à long terme de la culture par l'emploi d'organismes vivants, parmi ces derniers les *Trichoderma*. De nombreuses études ont rapporté et proposent l'utilisation des biopesticides dans les pratiques agronomiques, pouvant assurer une efficacité durable, comme une solution alternative ou complémentaire aux intrants chimique.

Les principales recherches sur le biocontrôle sont centrées sur l'utilisation de spores de *Trichoderma* directement sur les graines. Les technologies ne deviennent viables que lorsque les résultats de la recherche sont transférés du laboratoire au terrain. Bien que *Trichoderma* ait un très bon potentiel dans la gestion des maladies, il ne pouvait pas être utilisé comme suspension de spores sous champ.

Les conditions. Ainsi, la culture de *Trichoderma* doit être immobilisée dans certains porteurs et doit être préparé comme formulations pour une application facile, un stockage et l'utilisation sur le terrain. Par le présent travail, nous avons essayé de contribuer à la formulation d'une espèce qui appartient au genre *Trichoderma* et testé l'efficacité de ce produit (une poudre mouillable) sur un agent pathogène.

Cette étude a montré l'effet antagoniste in vitro du *Trichoderma* vis-à-vis du *Fusarium oxysporum*, agent responsable de flétrissement de petit pois il ressort :

En effet, les essais de confrontations entre *Fusarium* sp. et *Trichoderma* sp que ce soit d'une façon directe ou bien à distance in vitro et selon les trois formes testées (Etat frais, lyophilisé et formulé) ont montres des résultats probants. Le contact direct entre les deux champignons, *Trichoderma* envahit les colonies de *Fusarium* sp et dans le cas de confrontation indirecte, une réduction du diamètre des colonies de *Fusarium* sp a été observée par rapport au témoin non traité.

Cela prouve qu'en plus de son pouvoir de compétition, *Trichoderma* peut agir par la sécrétion de substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène.

par ailleurs, le test de biocontrôle menée avec des souches antagonistes lyophilisées et aussi formulés ont révélés des taux d'inhibition variée respectivement de 76% à 100%.

En général, bien que les agents de lutte biologique donnent de bons résultats dans la gestion des maladies des plantes, ils sont très sensibles aux fluctuations des conditions environnementales et sont incompatibles dans leurs performances. La consistance des agents de lutte biologique pourraient être améliorés grâce à plusieurs moyens parmi eux la formulation sous différentes formes solide ou liquide.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- L'identification des métabolites bioactifs de *Trichoderma* par chromatographies.
- Criblages des métabolites secondaires d'intérêts.
- Tester l'activité antifongique in vivo des souches *Trichoderma* formulés.
- Chercher d'autres types de formulation.
- Optimiser les conditions de la lyophilisation (pour une bonne viabilité et une bonne conservation).
- Optimiser les conditions de la formulation.

Références bibliographiques

- Ahmad, S., Khan, I.A., Hussain, Z., Shah, S.I.A., Ahmad, M. (2007)- Comparison of a Biopesticide with Some Synthetic Pesticides against Aphids in Rapeseed Crop. *Sahrad Journal of Agriculture*, 4: 1117-1120.
- Al alam J., 2017- Polluants organiques : analyse, application au « biomonitoring environnemental et introduction des biopesticides (algues marines) comme alternative, Chimie analytique, université Strasbourg en cotutelle avec l'université Libanaise, 302 p. Disponible sur: https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://tel.archivesouvertes.fr/tel02917953/document&ved=2ahUKEwjHydGqoq_4AhXD_KQKHVRrAFMQFnoECAsQAQ&usg=AOvVaw1LhCEi_rSQ1X2_smqRy28i Consulté le 17 mai 2022 00:56.
- ALEXANDER S.R., AREF A.A. & SMITH M.S., 1992. Palatable solid pesticidal compositions of ethylene and vinyl acetate copolymer. United States. Patent., 5 :135.
- ANGUS T.A., 1954. Use of methyl cellulose in laboratory tests of bacterial pathogens of insects. *Can. Ent.*, 86:206.
- ANGUS T.A., 1954. Use of methyl cellulose in laboratory tests of bacterial pathogens of insects. *Can. Ent.*, 86:206. ANGUS T.A., 1959. Potential usefulness of vinyl latices as stickers. *Can. Ent.*, 254-255.
- Ammad F, 2015- Caractérisation de souche fongique *Trichoderma* sp .
- Ait kaki A., 2014- Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agro-alimentaire, *Microbiologie*, Université Constantine 1, 113p
- Atamna Y., Bouchkara H., Ghouil R., 2008- les biopesticides microbiens application dans la lutte biologique, *Microbiologie*, Université de Jijel, 45p.
- Baker. R., 1988- *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants, *CRC Crit. Rev. Biotechnol*, 7 (2) : 97-106.

- Bambara D., Tiemtoré J., 2008-Efficacité biopesticide de *Hyptis spicigera* Lam., *Azadirachta indica* A. Juss. et *Euphorbia balsamifera* Ait. sur le niébé *Vigna unguiculata* L. Walp, *Tropicultura*, 26(1):53-55.
- Baron N. C., Rigobelo E. C., Zied D. C., 2019- Filamentous fungi in biological control: Current status and future perspectives. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(2):307–315.
- BEHLE R.W., MCGUIRE M.R. & SHASHA B.S., 1996. Extending the residual activity of *Bacillus thuringiensis* with casein based formulations. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1399-1405.
- BEHLE R.W., MCGUIRE M.R. & SHASHA B.S., 1997. Effects of sunlight and simulated rain on the residual activity of *Bacillus thuringiensis* formulations. *J. Econ. Entomol.*, 90: 1506-1516.
- BERTO P., DICKBURT C. & LEPOIVRE P., 2002. Biopesticide compositions. *European. Patent.*, 1: 238.
- Bissett J., 2004 - Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fungi_microscopic_fungi_definition.html. 12-BAHA., (2009) - Fiche variétale d'agrumes. Maroc, (14377): 25.
- BOHM H.A. & FRIEND D.R., 1990. Microencapsulated insecticidal pathogens. *United. States. Patent.* 4 :948.
- BOK S.H., LEE H.W., SON K.H., KIM S.U., LEE J.W. & KIM D.Y., 1993. Process for preparing coated microbial pesticides and pesticides produced therefrom. *United. States. Patent.*, 5 : 273.
- Boland G. J., 2004- Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(1): 6–18.
- Boyetchko S., Pedersen E., Punja Z., Reddy M., 1998- Formulation of biopesticides. In Hall, F. R. and Menn J. J. (eds.), *Biopesticides: Used and Delivery Methods in Biotechnology* : 487-508.
- Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valero, J.R., 2006- Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2): 323-342.
- Caron J., 2002- *Phytopathologiste Horti_protection inc.* Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*, 5 décembre 2002 ,St_Rémi : 1-4 . Site web [en ligne]. Disponible sur

https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.agrireseau.net/petitsfruits/documents/trichoderma.pdf&ved=2ahUK Ewj4g6nena_4AhXlh_0HHR7fCtoQFnoECAUQBg&usg=AOvVaw08lpud pImJPqW_RcjeJhQ4

- CARRM.E., DOANE W.M., WING R.E. & BAGLEY E.B., 1993. Starch encapsulation of biological active agents by a continuous process. United. States. Patent. 5 :183.
- Chauffaux J., 1995- UTILISATION DE BIOPESTICIDES CONTRE LES RAVAGEURS DES CULTURES. LE POINT SUR *Bacillus thuringiensis*. *Revue Horticole* d'oct,(97): 2.
- Chamont S., 2020- les baculovirus. Site web [en ligne]. Disponible sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/11109/Hypp-encyclopedie-en-protection-des-plantes-Les-baculovirus> Consulté le 10 mai 2022 23:03.
- Chermiti, B., Abbes, K. (2012)- Comparison of Pheromone Lures Used in Mass Trapping to Control the Tomato Leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) in Industrial Tomato Crops in Kairouan (Tunisia). *EPPO Bulletin*, 2,: 241-248. <https://doi.org/10.1111/epp.2561>
- Cherif, M., Omri, N. et Boubaker, A. 1996. Etude sur les champignons antagonistes *Gliocladium*, *Trichoderma* et *Pythium oligandrum*. Actes des 3èmes journées Nationales. sur les acquis de la Recherche Agro-Vétérinaire Halieut.- Nabeul- 29/11-1/12/1996. pp 104-110
- COUCH T.L. & IGNOFFO C.M., 1981.. Formulation of insect pathogens, in microbial control of pests and plant diseases. IN: BURGESS HD, London: Academic Press : 621-634.
- Cournut B., 1984- Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th : Pharmacie : Marseille : 77 .
- CROSS J.V. & POLONEKO D.R., 1996. An industry perspective on registration and commercialization of biocontrol agents in Canada. *Can. J. Plant. Pathol.* 18: 446-454.
- Davet , P . 1983. Les *Trichoderma*, exemple de champignon antagoniste d'agents pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture, pp. 193-204. ACTA, INRA- ENSAM Montpellier (FR)
- Dennis.C ., Webster.J., 1971- Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57 : 25-39.

- Denis, C et Webster, I., 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* production of volatile antibiotic. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 41-48.
- Deravel J., Krier F., Jacques P., 2014- Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 18(2), 220–232.
- DUBOIS N.R., REARDON R.C. & MIERZEJEWSKI K., 1993. Field efficacy and deposit analysis of *Bacillus thuringiensis*, Foray 48B, against *Gypsymoth*. *J. Econ. Entomol.*, 86: 27-33.
- DUNKLE R.L. & SHASHA B.S., 1988. Starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.*, 17: 120-126.
- Dubos B., 1985. L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pourzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, 35-49. INRA, Paris (FR).
- Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
- EJIOFOR A.O. & OKAFOR N., 1991. Formulation of a flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 spores and crystals as mosquito larvicide. *J. Appl. Bacteriol.*, 71: 202-208.
- Eiben, U., Lu" th, P. (2006)- Development of Novel Fungal Biocontrol Agents http://orgprints.org/7717/1/short_paper,_prophyta,14.03.06.PDF (Date d'accès: October 2011)
- El-Sayed W., 2005- Biological Control of Weeds with Pathogens: Current Status and Future Trends. *Journal of Plant Disease and Protection*, 112(3): 209-221.
- Esposito E., Silva M., 1998- Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol*, 24 (2): 89-98.
- FARRAR R.R. & RIDGWAY R.L., 1995. Enhancement of activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against four Lepidopterous insect pests by nutrient based phagostimulants. *J. Entomol. Sci.*, 30: 29-42.
- Galko, J., Nikolov, C., Kunca, A., Vakula, J., Gubka, A., Zúbrik, M., Rell, S., Konopka, B. (2016)- Effectiveness of Pheromone Traps for the European

SpruceBark Beetle: AComparative Study of Four Commercial Products and Two NewModels. LesníckyCasopis-Forestry Journal, 62: 207-215.

- GAUDET M.D. & PURITCH G.S., 1989. Fattyacidsaltenhancement of bacterial insecticide. United. States. Patent., 4 :826.
- Genilloud O., Pelaez F., Gonzalez I.,et Diez M T.,1994- Diversity on actinomycetesand seaweeds from the Iberian coasts. Microbiologia, 10 : 413-422.
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Ko" hl J., MarroneP.,Louise Morin L., Stewart A., 2012- Have biopesticides come of age?.Trends inBiotechnology:1-9.
- HENDERSON & JACK A., 1994. Insecticide carriers and insecticides. United. States. Patent. 5: 326.
- Hibar, K., M. Daami-Remadi, H. Khiareddine et M. El Mahjoub. 2005. Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichodermaharzianum* sur *Fusariumoxysporum* f. *sp. radicles-lycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (3) : 163-171.
- Hanson, L. E. and Howell, C. R. 2002. Biocontrol efficacy and other characteristics of proplaste fusants between *Trichoderma koningii* and *T virens*. Mycological Research. 1063 : 321-328.
- Hoffmann C. & Thiery D., 2020- Confusion sexuelle pour le contrôle des tordeuses dela vigne - Points clefs pour la mise en œuvre dans différentes régions viticolesEuropéennes.In Endure. hal-02821302, p4.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease87: 4-10.Dodd et al. (2003), Samuels et al. (2002
- Jacques P., Krier F., Deravel J. Coutte, F., Béchet, M., Leclère, V., Chollet, M.,Coucheney, F., Boistel C., 2014- Les lipopeptides d'origine microbienne. Phytoma,672, 38-42.
- JANKEVICA J. & ZARINS I., 1997. Biological control of *Malacosamaneustria* L. population withLatvianisolate of nuclearpolyhedrosis virus. In: Evans HF, editor. Microbial insecticides: novelty or necessity? Symposium Proceedings No. 68 British Crop Protection Council :285-288.
- Kenis, M., Hurley, B.P., Hajek, A.E., Cock, M.J.W. (2017)- Classical BiologicalControl of Insect Pests of Trees: Facts and Figures. Biological Invasions, 19: 3401-3417.<https://doi.org/10.1007/s10530-017-1414-4>

- Khan, A.I., Hussain, S., Akbar, R., Saeed, M., Farid, A., Ali, I., Alam, M., Shah, B.(2015)- Efficacy of a Biopesticide and Synthetic Pesticides against Tobacco Aphid, *Myzus persicae* Sulz. (Homoptera, Aphididae), on Tobacco in Peshawar. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4: 371-373.
- Knowles A., 2001-Trends in Pesticide Formulations:89-92. *Agrow Reports*, UK: PJB Publications Ltd. D215.
- Knowles A., 2005- New developments in crop protection product formulation:153-156. *Agrow Reports UK: T and F Informa UK Ltd*.
- Knowles A., 2008-Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist*, 28(1), 35-44. doi:10.1007/s10669-007-9045-4
- Korangi Alleluya V., Kubindana G., Fingu Mabola J., Sulu A., Kasereka G., Matamba A., Ndirindiri J., 2021- Utilisation des biopesticides pour une agriculture durable en République Démocratique du Congo (Synthèse bibliographique). *Revue Africaine d'Environnement et d'Agriculture*, 53-67.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005)- Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23: 567–575. doi: 10.1038/nbt1095
- Krafft L .P., Roquebert M.F., 1981- Analyse des interactions entre deux champignons antagonistes : *Trichoderma viride* Pers. et *Botrytis cinerea* Pers. *Ex Fr. Études préliminaires. Cryptogam. Mycol* , 2 : 137-151.
- Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I., Kullining-Grzdinger C. et Szakacs G., 2003- Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.; a case study on south-east asian isolates. *Fungal Genet. Biol* ,38 (3) : 310-319.
- Kumar S., 2012 - Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. *J Biofertil Biopestici* 3:e107. doi:10.4172/2155-6202.1000e107.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A. and Jiménez-Díaz, R. M. 2004. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94: 946-960
- LEBO S.E. & DETROIT W.J. 1996. Method for microencapsulation of agriculturally active substances. United States Patent. 5 :552.

- Lengai G. M. W., Muthomi J. W., 2018- Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. *Journal of Biosciences and Medicines*, 06(06), 7–41.
- Leng P., Zhang Z., Pan G., Zhao M., 2011- Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19864–19873.
- Lepoivre P., 2003. *Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. De Boeck Supérieur. <https://books.google.com/books?id=JpeG4zBh6sMC&pgis=1>.
- LEVY R., 1991. Flowable insecticidal delivery compositions and methods for controlling insect populations in an aquatic environment. United States Patent, 4: 985. LEVY R., 1991. Terrestrial delivery compositions and methods for controlling insect and habitat-associated pest populations in terrestrial environments. United States Patent, 4: 983. LEVY R., 1998. Insecticidal delivery compositions and methods for controlling a population of insects in an aquatic environment. United States Patent. 5: 824.
- LISANSKY S.G., QUINLAN R.J. & TASSONI G., 1993. *The Bacillus thuringiensis production handbook*. Newbury: CPL Press :124.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. and Jansson, J. K. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3073-3081
- LOSEL P., PENNERS G. & WEISSMULLER J., 1998. Insecticidal attract-and-kill formulations. United States Patent. 5 :707.
- Lynch J.M., Lumsden R.D., Atkey P.T., Ousley M.A., 1991- Prospects for control of *Pythium* damping-off of lettuce with *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Enterobacter* spp. *Biol. Fertil. Soils*, 12 : 95-99.
- MARSHALL L.G.I., 1999. Biological control agent biocarriers and method of formation. United States Patent. 5 : 888.
- Matthews G. A., Bateman., Lacey R.P., Miller P. H. C., 2014- *Pesticide application methods*. fourth ed. Wiley, UK.
- MCGUIRE M.R., SHASHA B.S. & LEWIS L.C., 1990. Field evaluations of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 2207-2210.

- MCGUIRE M.R., STREETT D.A. & SHASHA B.S. 1991. Evaluation of starch encapsulation for formulation of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) entomopoxviruses. *J. Econ. Entomol.*, 84:1652-1656.
- MCGUIRE M.R., SHASHA B.S., LEWIS L.C. & NELSON T.C., 1994. Residual activity of granular starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 84:631-637
- MCKIBBEN G.H., DICKENS J.C. & SMITH J.W., 1994. Plastic bait composition for attracting and killing crop pests. United States Patent. 5: 290.
- Minz, S., Samuel, C.O., Tripathi, C.S. (2012) - The Effect of Plant Extracts on the Growth of Wilt Causing Fungi *Fusarium oxysporum*. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1: 13-16. <https://doi.org/10.9790/3008-0411316>
- MONTERMINI A., NANNI C., BOSELLI M., 1993. Integrated defence of poplar: two years trials against *Hyphantria cunea* (Drury) with a new microbial formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* distributed by helicopter. ANNP-BCPC second international symposium on pesticide application techniques, Strasbourg; 22-24 September.
- MORRIS O.N., CONVERSE V. & KANAGARATNAM P., 1994. Chemical additive effects on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* against *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 88:815-824.
- MUNSON D., LEW C.W., GAGGERO J.M. & BRANLY K. (1996) Aqueous solvent encapsulation method, apparatus and microcapsules. United States Patent., 5 :571.
- Moscardi, F. (1999)- Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.257.
- Muslim A., Horinouchi H., Hyakumachi M., 2003- Control of *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato with Hypovirulent Binucleate *Rhizoctonia* in Soil and Rock Wool Systems. *Plant Disease*, 87(6): 739-747.
- NAVON A., 1993. Control of Lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, editors. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. New York: 125-146.

- Ngegba, P.M., Kanneh, S.M., Bayon, M.S., Ndoko, E.J., Musa, P.D. (2018)- Fungicidal Effect of Three Plants Extracts in Control of Four Phytopathogenic Fungiof Tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) Fruit Rot. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 1: 112-117.
- Olivier, J. M. et Germain, R. 1983. Etude des antibiotiques volatils des *Trichoderma*. In : Les antagonismes microbiens mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes. 24ème colloque de la société française de phytopathologie, Bordeaux (26-28 mai) 1983. Ed. INRA, pp, 17-34
- PAREKH S., VINCI V.A. & STROBEL R.J., 2000. Improvement of microbialstrains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:287-301.
- PRABAKARANG.,PADMANABHANV.&BALARAMANK.,2001.Developme ntof a self floating slow release formulation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and itslarvicidalactivity. *Indian. J. Exp. Biol.*, 39 : 82-84.
- PRABAKARANG.,PADMANABHANV.&BALARAMANK.,2001.Developme ntof a self floating slow release formulation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and itslarvicidalactivity. *Indian. J. Exp. Biol.*, 39 : 82-84.
- Powell, W., Pickett, J.A. (2003)- Manipulation of Parasitoids for Aphid PestManagement: Progress and Prospects. *Pest Management Science*, 59: 149-155.<https://doi.org/10.1002/ps.550>
- PURITCH G.S., MCHARG D., BRADBURY R. & MASON W., 1991. Supersorbentmaterial as pesticide potentiator. *United. States. Patent*. 5: 037.
- Rao, K.S., Vishnupriya, R., Ramaraju, K. (2017)- Efficacy and Safety Studies onPredatory Mite, *Neoseiuluslongispinosus* (Evans) against Two-Spotted Spider Mite,*Tetranychusurticae* Koch under Laboratory and Greenhouse Conditions. *Journal ofEntomology and ZoologyStudies*, 4: 835-839.
- Ravensberg W.J. (2011)- A Roadmap to the Successful Development andCommercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods,*Springer*
- Refki, E., Sadok, B.M., Ali, B.B., Faouzi, A., Jean, V.F., Rudy, C.M. (2016)- Effectiveness of Pheromone Traps against *Tutaabsoluta*. *Journal of EntomologyandZoologyStudies*, 6: 841-844.
- RIDGWAY R.L., ILLUM R.R., FARRAR J.R., CALVIN D.D., FLEISCHER S.J. & INSCOE M.N., 1996. Granular matrix formulation of *Bacillus*

thuringiensis for control of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol., 89: 1088-1094.

- Rizvi, S.A.H., Hussain, S., Rehman, U.S., Jaffar, S., Rehman, M.F.U. (2016)- Efficacy of Ecofriendly Botanical Extracts of Ginger (*Zingiber officinale*), Garlic (*Allium sativum*) and Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) for the Control of Cabbage Looper (*Trichoplusia binotalis*) under Agro Ecological Conditions of Peshawar. Pakistan. Journal of Entomology and Zoology Studies, 1: 88-90.
- Roquebert M F., 1996- 135 Références bibliographiques 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.
- Sanchis v., Lereclus D., 1999- *Bacillus thuringiensis*: un modèle biotechnologique. Journal de la Société de Biologie, 193 (6): 523–530.
- Sarles, L., Verhaeghe, A., Francis, F., Verheggen, F.J. (2015)- Semiochemicals of *Rhagoletis* Fruit Flies: Potential for Integrated Pest Management. Crop Protection, 78:114-118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.09.001>
- Seaman D., 1990-Trends in the formulation of pesticides: An overview. Pesticide Science, 29(4), 437. doi:10.1002/ps.2780290408
- Sellami S., Tounsi S., Jamoussi K., 2015- La lutte biologique, alternative aux produits phytosanitaires chimiques. Journal Of New Sciences, Agriculture and Biotechnology, 19(5), 736–743.
- Senthil-Nathan S., 2015- A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. In P. Thangavel & G. Sridevi (Eds.), Environmental Sustainability: Role of Green Technologies (Springer D), pp. 324.
- Shah, J.A., Inayatullah, M., Sohail, K., Shah, S.F., Shah, S., Iqbal, T. and Usman, M. (2013)- Efficacy of Botanical Extracts and a Chemical Pesticide against Tomato Fruit Worm, *Helicoverpa armigera*. Sarhad Journal of Agriculture, 1: 93-96
- Sharma M., Guleria S., Singh K., Chauhan A., Kulshrestha S., 2018- Mycovirus associated hypovirulence, a potential method for biological control of *Fusarium* species. Virus Disease, 29(2): 134–140.

- SHAPIRO M. & VAUGHN J.L., 1995. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *J. Econ. Entomol.*, 88 : 265-269.
- SMIRNOFF W.A. & VALERO J.R., 1983. Characteristics of a highly concentrated *Bacillus thuringiensis* formulation against spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Ent.*, 115: 443-444.
- SMITH K.L. & HERBIG S.H. 1998. Labile insecticide compositions. United States. Patent. 5 :750.
- Sivan A, Chet I., 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J General Microbiol*, 135:675–682.
- Tadros F., 2005- Applied surfactants, principles and applications: 187-256. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.
- TAMEZ-GUERRA P., MCGUIRE M.R., MEDRANO-ROLDAN H. & GALAN-WONG L.J., 1996. Sprayable granule formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1424-1430.
- TAMEZ-GUERRA P., GARCIA-GUTIERREZ C., MEDRANO-ROLDAN H., GALANWONG L.J. & SANDOVAL-CORONADO C.F., 1999. Spray dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis*. *Mulsant. Southwest. Entomol.* 24: 37-48.
- TAMEZ-GUERRA P., MCGUIRE M.R., BEHLE R.W., SHASHA B.S. & PINGEL R.L., 2002. Storage stability of *Anagrapha falciferana* nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. *J. Invertebr. Pathol.*, 79: 7-16.
- TEERA-ARUNSIRI A., SUPHANTHARIKA M. & KETUNUTI U., 2003. Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *J. Econ. Entomol.*, 96 : 292-299.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2: 194-208.
- Vernner R., Bauer P., 2007- Q-TEO, a formulation concept that overcomes the incompatibility between water and oil. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 60(1):7-26.

- VIDYASEKARAN P. & MUTHAMILAN M., 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpeawilt. *Plant. Dis.*, 79: 782-786.
- Vining L C., 1990- Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol*, 44 :395-427.
- YANG C.C., PAN I.H., CHEN M.H., KAO S.S. & TSAI Y.S., 1995. Anti-ultraviolet biocidal composition. United. States. Patent. 5 :427.
- YARDIN M.R., KENNEDY I.R. & THIES J.E., 2000. Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as biofertilisers and biopesticides. *Rad. Phys. Chem.*, 57: 565-568.
- Werrie P. Y., Durenne B., Delaplace P., Fauconnier M. L., 2020- Phytotoxicity of essential oils: Opportunities and constraints for the development of biopesticides. *Review. Foods*, 9(9), 1–24.
- Widden P., Abitbol J., 1980- Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, 72: 775-784.
- Woods T.S., 2003-Pesticide Formulations. In AGR 185 in *Encyclopedia of Agrochemicals*:1-11. New York:Wiley & Sons.
- Zhihe , C. ; Qingping , W; Milfflong , X. et al. 1998 Advance of biocontrol of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *J. Microbiol*, 25(5): 284-286

Liens internet consultés :

- <https://inrs.ca/la-recherche/thematiques-de-recherche/microorganismes-et-biotechnologie> (consulté le 8 juillet 2022 00 : 15).
- <https://www.greenfacts.org/fr/ogm/3-organismes-genetiquement-modifies/1-biotechnologie-agricole.htm> (consulté le 8 juillet 2022 00 :26).
- <https://agriculture.canada.ca/fr/agriculture-environnement/lutte-antiparasitaire-agriculture/biopesticides> (consulté le 19 mai 2022 19 :30).
- <https://agronomie.info/fr/le-genre-trichoderma/> (consulté le 21 mai 2022 02 :23).
- <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Formulation.html> (consulté le 23 mai 2022 23 :23).
- <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://isaranet.fr/webcours/MOOC/res/Biopesticides.pdf&ved=2ahUKEwj-vuXxtZL5AhXqMewKHZo0B6oQFnoECC8QAQ&usg=AOvVaw0R1RWIvN1Sm4xX4ShfiRAE> (consulté le 11 mai 2022 14 : 06).
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7355703/> (Consulté le 13 Juin 2022 20 :12).

ANNEXES

Annexe 1

Matériel non biologiques

Tableau : Matériel non biologiques utiliser

Matériel du laboratoire	
Verreries	Appareillages
Boites Pétri	Balance
Pipette pasteur	Agitateur magnétique
Eprouvette	Plaque chauffante
Becher	Bec benzine
Entonnoir	Autoclave
Bareaumagnétique	Incubateur
	sonicateur

Annexe 2

Milieux de culture utilisés

- **Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)**
 - Mettre en suspension 39 grammes de PDA déshydraté dans un 1 litre d'eau distillée.
 - Secouer doucement jusqu'à obtenir un mélange homogène (agitateur magnétique).
 - Auto-claver sous une pression de 1.4 bar à la température de 125 °C durant 30 minutes.
 - Laisser les flacons refroidir puis couler la solution sur les boîtes pétries.
 - Laisser sécher pendant 2 heures.

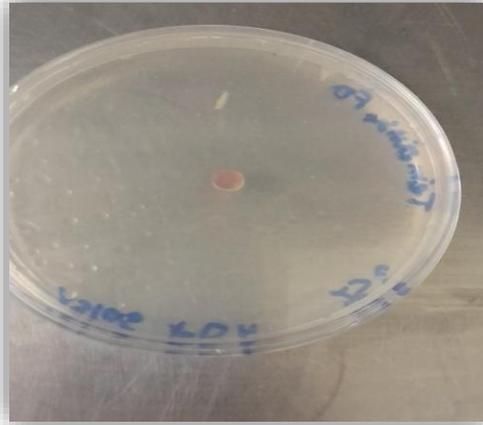
Annexe 3

Purification de la souche *Trichoderma*



Annexe 4

Repiqage de l'agent phytopathogène



Annexe 5

Test biocontrolle de l'agent anatgoniste formulé

